

生命科学实验指南系列

Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications

(7th Edition)

动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南

（原书第7版）



〔英〕R. Ian Freshney 著

章静波 徐存拴 等 译



科 学 出 版 社

(Q-4341.31)

本书是从事细胞培养研究不可或缺的权威资料，它以全面、详细、严密、新颖、实用而赢得赞誉，无愧于细胞培养领域的领衔之作。

新版的主要特点

- 方案与程序描述条理清晰，易于运作并强调安全性与生物伦理问题
- 特邀专家撰写9篇minireview，包括干细胞与再生医学、3D培养、高通量筛选等，指出当前进展与未来发展方向
- 内容丰富，更多补充材料、补充方案可于网站中获取
- 培训纲要的练习步步深入，某些练习还有变通性操作，有利于受培训者开拓思路，娴熟技巧
- 对不稳定性、污染和错误鉴定等均有适当提示，以保证实验与练习的高质量

作者简介

本书作者R. Ian Freshney是英国格拉斯哥大学癌症科学荣誉资深研究员，迄今出版多部专著，是细胞培养技术领域的世界著名专家。



WILEY



科学出版社 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn



科学出版社
互联网入口



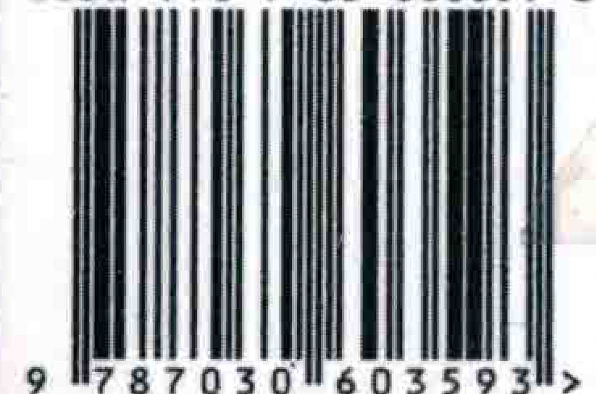
生命科学订阅号
赛拉艾美



本书更多资源
请扫码

生命因你而精彩！

www.sciencep.com



ISBN 978-7-03-060359-3

销售分类建议：生物/细胞生物学

定 价：328.00 元

生命科学实验指南系列

动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南

（原书第7版）

Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications（7th Edition）

〔英〕R. Ian Freshney 著

章静波 徐存拴 等 译

科学出版社

北 京

图字：01-2013-6032 号

内 容 简 介

自本书第 6 版发行以来，细胞培养领域已取得诸多进展，第 7 版除保留基本内容（培养细胞的生物学、细胞培养实验室的设计与布局、培养器皿与培养基、原代培养、细胞系及其鉴定、污染、分化、老化、永生化等）之外，特别强化了某些章节的内容，尤其见于 3D 培养、干细胞、特殊类型细胞培养、STR 测序、规模化培养等的介绍，因此第 7 版无论是在理论上还是在技术上均更具新颖性和实用性。

本书可供学术研究人员、临床医生、生物制药研究者、有关学科大学师生尤其是研究生，以及细胞和分子生物学与遗传学研究及实验室管理人员，特别是培训老师、技术人员与受培训人员阅读参考。

图书在版编目（CIP）数据

动物细胞培养：基本技术和特殊应用指南：原书第 7 版/（英）R. I. 弗雷谢尼（R. I. Freshney）著；章静波等译. —北京：科学出版社，2019.1
（生命科学实验指南系列）
书名原文：Culture of Animal Cells：A Manual of Basic Technique and Specialized Applications(7th Edition)
ISBN 978-7-03-060359-3

Ⅰ.①动… Ⅱ.①R… ②章… Ⅲ. ①动物–细胞培养 Ⅳ.①Q954.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 300914 号

责任编辑：李 悦 刘 晶 / 责任校对：王晓茜 严 娜
责任印制：吴兆东 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京虎彩文化传播有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2019 年 1 月第 一 版 开本：889×1194 1/16
2019 年 1 月第一次印刷 印张：52 1/2
字数：1185 000

定价：328.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

参 译 人 员

（以章节排序）

章静波　（中国医学科学院基础医学研究所）
马　杰　（郑州大学第一附属医院）
徐存拴　（河南师范大学生命科学院）
陈实平　（中国医学科学院基础医学研究所）
冯海凉　（中国医学科学院基础医学研究所）
刘玉琴　（中国医学科学院基础医学研究所）
李康华　（中国医学科学院基础医学研究所）
黄　姗　（中山大学中山眼科中心）
杨振丽　（中国医学科学院基础医学研究所）
卞晓翠　（中国医学科学院基础医学研究所）
陈　曦　（北京大学人民医院生殖医学中心）
石　程　（北京大学人民医院生殖医学中心）
谭玉珍　（复旦大学上海医学院）
钱晓菁　（中国医学科学院基础医学研究所）
王世华　（中国医学科学院基础医学研究所）
向若兰　（北京大学医学部）
杨燕丽　（中国医学科学院北京协和医院）
王海杰　（复旦大学上海医学院）
韩　钦　（中国医学科学院基础医学研究所）
薛惠文　（中国医学科学院基础医学研究所）
安　威　（首都医科大学基础医学院）
王莎丽　（中国医学科学院基础医学研究所）

审　　校

章静波　徐存拴　陈实平

译 者 的 话

时隔5年，《动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南》（原书第7版）又如期面世了，我们团队接手翻译工作也已4轮（自原书第4版始）。我们十分感激读者对译著的认可，以及科学出版社编辑对我们的信任。

《动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南》的连续出版，表明了动物细胞培养技术在自然科学乃至生产实践中的重要地位，以至于我国的科学家将培养的细胞随宇宙飞船送入天体，期望小小的细胞为人类探索生命科学带来前所未有的信息。我们翻译团队将细胞培养最基本、最新颖的理论与技术及时介绍给读者，也意味着我们对我国生命科学研究与开发作出了或多或少、或大或小的贡献，对此我们感到一丝安慰。

历经4轮翻译，译者积累了一定的翻译经验，更在翻译过程中进行了“充电”。但是生命科学的发展十分迅速，新的理论、新的技术层出不穷，这在细胞培养技术领域也得到充分反映，诸如各型干细胞的建系与鉴定、3D技术在细胞培养中的应用、DNA测序与编码、细胞培养与再生医学等的萌生与发展，无不要求细胞培养技术及时跟进自然科学的发展，而不仅仅限于“经典的”“常规的”操作。为此也给译者带来了巨大的压力。我们十分赞赏作者在第5版、第6版及本书中一再的题词，即“谨以此书献给我众多的朋友和同事，多年来他们的帮助和建议使我能将此书的内容扩展到我经验所不及的领域”。作者尚且认为自己有经验所不及之处，何况我们译者在理论上及经验上可能有更多“不及”之处。为此我们只能从各方面努力，采取一切可能的措施将“不及”的内容译好。这里我们再套用作者的一句话，即“听到有人指出本书的不足，对此我们将乐于纠正”。这也正是我们译者的责任与担当所在。

《动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南》（原书第7版）中译版出版了，我们期待它如前几版一样受到读者的认可，我们更期望它在我国动物细胞培养技术及其生命科学研究、再生医学与生物技术药物开发等领域的发展中有较大的促进作用。

译者团队

2018年10月

前言和致谢

1983 年，当本书初版之时，细胞培养主要还属于一种研究工具，使用者很少。当时人们对细胞培养缺乏信任，疑虑它是否可提供与体内过程相关的信息。后来，主要出于病毒学和分子遗传学的需要，并为了生产生物药剂，方将细胞培养的运用扩展到大企业的生产过程中。如今，本领域已得到进一步的延伸，其中，涉及令人兴奋的干细胞研究、再生医学和高通量药物筛选。或许当今进展中一个最令人鼓舞的方面是我们现已握有“圣盘”（holy grail）（holy grail 原意为耶稣在最后晚餐时所用的圣盘，后转义为稀世珍宝。此处转意为我们已掌握了绝顶的研究技术——译者注），借此可以操纵培养中有充分功能的特化细胞（specialized cell）。选择培养条件与基因表达操纵相结合意味着我们不仅能够分离和培养特化细胞，还可以从“现货供应”中购得。此外，我们还能唤醒原始干细胞和成熟细胞基因表达的可塑性（以前人们曾认为它们的命运是早已被决定了的），从而为我们研究正常和异常发育，以及通过操纵基因型及其表达来治疗疾病提供了机会。

本书（第 7 版）的一个明显革新是我们聘请了 3 位审读人，他们是 Amanda Capes-Davis、Carl Gregory 和 Stefan Przyborski。他们协助我审读有关内容，使我能与时俱进，跟上我可能不熟悉的那些进展。我真诚地感谢他们的倾力相助。本书还增加了 9 篇小型综述。我深感细胞培养及其诸多的分支领域有许多进展已超越了我的经验和理解力，因此我得到了各个特殊领域各位专家的帮助，并提供了他们在特殊领域中的简要综述，以期为读者指出细胞培养的发展方向，以及从何处获得进一步的信息。这样的编排有利于那些将细胞培养作为他们研究生训练，或是事业发展的一个部分的迫切需要，其中不仅指出了能提供什么样的技术，而且指出了未来事业会朝何处发展。

一如既往，我万分感激提供实验方案及小型综述的作者，也感激对我不完全了解的领域提出建设性意见的同行们。其中，特别是 Rob Hay（获知 Rob 于 2014 年辞世，对此我表示深切哀悼），他经常给予我帮助并提出建议，我们在格拉斯哥（Glasgow）一起攻读博士学位时已成为挚友，那时他工作在实验台的东端，我在西端。

多年来给予我帮助和提出建议的其他人还有 Robert Auerbach、Bob Brown、Mike Butler、Kenneth Calman、Richard Ham、Stan Kaye、Nicol Keith、John Masters、Wally McKeehan、Rona Mckie、Stephen Merry、Jane Plumb、Peter McHardy、Peter Vaughan、Paul Workman、Norbert Fusenig、Roland Grafströn、John Paul（已故），以及 ECACC 的成员 Isobel Atkins、Jim Cooper、David Lewis、Chris Morris、Ed Burnett 和 Peter Thraves。我还有幸与 David I. Graham、David G. T. Thomas、Anne-Marie McNicol 及已故的 John Maxwell Anderson 进行临床协作。在本书的前期准备阶段我还得益于与 Dor Dougall、Peter del Vecchio、Sergey Federoff、Mike Gabridge、Dan Lundin、John Ryan、Jim Smith 及已故的 Charity Waymouth 的讨论。我对 Paul Chapple 感激不尽，最初是他劝说我应当写一本有关组织培养基本技术的教科书。书中许多原创性的插图是由 Jane Gillies 和 Marina LaDuke 绘制的，尽管出于电子版的要求，其中不少现已被其他图片所取代。我十分感激 ATCC 的 Yvonne Reid 和 Grey Sykes，ECATT 的 Peter Thraves 及许多其他朋友。他们慷慨馈赠我有关的细胞和细胞系的图片，我谨希望通过这些图片可以激励读者更加仔细地观察他们自己的细胞，并促使他们对常规维持的细胞出现改变时加倍警觉。书中的某

些资料则是由与我共事多年的同仁提供的，其中包括 Sheila Brown、Ian Cunningham、Lynn Evans、Margaret Frame、Elaine Hart、Mohammad Zareen Khan、Alison Mackie、Carol McCormick、John McLean、Alistair McNab、Alex MacPhee、Diana Morgan、Alison Murray、Irens Osprey 及 Natasha Yevdokimova。

32 年前，《动物细胞培养》第 1 版不到 300 页，至第 6 版已增至 700 多页，本版还会有所增加。我决定将某些比较特殊的方案以在线方式放在补充材料内。不然的话，所谓实验室指南则成为搁置于图书馆架上的巨书。

本书的大部分内容，我仍然保留着前几版的重点，并用较特殊的培养和方法作为实例，着重介绍某些基本技术。我们以详细的、一步一步的方案来描述，这样做应可提供足够的信息来进行操作，而不必寻求于原始文献。每一个方案中还有一段导言来解释其背景，以及提供其他操作程序和可以利用的补充信息。一如前述，还有必要提供某些其他方案作为补充材料*，它们可于在线的版本中找到，并标以后缀“-Su”。虽然在第 2 章中我们介绍了某些基本生物学知识，但我们认定读者已经具有解剖学、组织学、生物化学及细胞和分子生物学基本知识，因此本书的对象是那些以往缺乏组织培养经验的人们，其中包括接受培训的技术员、高年级大学生、研究生、博士后人员，以及对实验室感兴趣的临床医生。这些人中的大多数以前只活动于学术界和研究所，如今绝大多数人可能已供职于生物技术和药物制造企业。

方案以另外一种醒目的形式编排，以区别于其他正文。由于许多方案由特邀作者撰写，他们的名字被列于方案之前。我以特殊格式来明确区别。对于某一特殊方案所用的特殊试剂则详列于方案的材料栏目中，而常用试剂的配方，诸如 Hanks' BSS 或胰蛋白酶则置于本书末尾附录Ⅰ中。设备和材料的详细来源的资料附于每章之后，以及附录Ⅲ和附录Ⅳ中的供应商名录，它们仅可于在线的补充材料中找到。由于在互联网上可以容易找到不同项目的供应者，有关所需供应商资料的信息或多或少有些缩减。但我们仍在每章中提供了有关信息，并汇集于补充材料中。此外，每章中都附有参考文献，并且与以往一样，未附于书末。

本书所采用的缩略语列于前言之后。例如，遍及全书的惯用词 D-PBSA 所指为无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecc's PBS，而 UPW 指的是不限用什么方法制备的超纯水。另外，层流洁净工作台（laminar-flow hood）一词已取代生物安全橱（biological safety cabinet，BSC）。只要有可能，浓度均以体积克分子浓度（molarity）来表示。我想极少有人会自己去配制培养基，因此在溶液表中未列入真正的质量，但是有些读者很可能会去比较它们的成分，此时摩尔当量（molar equivalent）则更加实用。

我有幸地得到了 John Wiley & Sons 编辑部成员的建议和支持。我同样由衷地感谢所有不厌其烦地对前几版向我和 John Wiley & Sons 提出建议及建设性批评意见的人们。听到有人说他们可从拙著中获益，我会感到心满意足。但更为重要的是听到有人指出本书的不足，对此我将乐于纠正。我谨希望本书的使用者和我一样保持不变的激情，企盼细胞培养领域出现更加亮丽的前景。

我十分感谢我的女儿 Gillian 和儿子 Norman，多年之前他（她）们已帮助我编写第 1 版，此后还不间断地提出建议和提供支持。我尤其要感谢我的夫人 Mary，她废寝忘食地参与编撰、校对及处理诸多其他事物，没有她的鼎力相助，第 1 版不可能问世，也不能在指定的日期前完成本版的修订，更不可能达到技术精确性的必需水平，而这一点正是造就一部精品组织培养指南的关键所在。

R. Ian Freshney

（章静波　译）

---

* 原书中提供的补充材料可扫描二维码，在多媒体材料中获取。

缩 略 语

2D	two-dimensional	二维的
3D	three-dimensional	三维的
ABC	antibiotic-containing(solution)	含抗生素的（溶液）
ACDP	Advisory Committee on Dangerous Pathogens	危险病原体咨询委员会
ACM	astrocyte conditioned medium	星状细胞条件培养基
AEC	Animal Ethics Committee	动物伦理委员会
AFP	α-fetoprotein	甲胎蛋白
ALL	acute lymphocytic leukemia	急性淋巴细胞白血病
ALT	alternative lengthening of telomere	端粒的替代性延长
AML	acute myelocytic leukemia	急性髓细胞白血病
ANSI	American National Standards Institute	美国国家标准研究所
AQIS	Australian Quarantine and Inspection Service	澳大利亚检验检疫局
ASC	adult stem cell	成体干细胞
AST	aspartate aminotransferase	天冬氨酸氨基转移酶
ATCA	American Tissue Culture Association（now SIVB）	美国组织培养协会(现简称 SIVB)
ATCC	American Type Culture Collection	美国模式培养物收集中心，美国菌种保藏中心
ATP	adenosine triphosphate	腺苷三磷酸
BAE	bovine aortic endothelium	牛主动脉内皮细胞
BAEE	*N*-α-benzoyl-L-arginine ethyl ester	*N*-α-苯酰基-L-精氨酸乙酯
BCC	basal cell carcinoma	基底细胞癌
BCR	basal cell receptor	基底细胞受体
BCT	B-cell targeting (hybridoma technique)	B 细胞靶向（杂交瘤技术）
BFU-E	erythroid burst-forming unit	红细胞暴发型（集落）形成单位
BMP	bone morphogenetic protein	骨形态形成蛋白
bp	base pair (in DNA)	DNA 的碱基对
BPE	bovine pituitary extract	牛垂体提取物
BPH	benign prostatic hyperplasia	良性前列腺增生
Bq	Becquerel	可贝（放射单位）
BrdU	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BSC	biological safety cabinet	生物安全橱

BSE	bovine spongiform encephalitis	牛海绵样脑病（疯牛病）
BSS	balanced salt solution	平衡盐溶液
BSS-PR	BSS without phenol red	无酚红平衡盐溶液
BUDR	bromodeoxyuridine	5-溴脱氧尿苷
CAFC	cobble stone-area-forming cell	卵石区形成细胞
CAM	cell adhesion molecule; chorioallantoic membrane	细胞黏附分子；尿囊绒膜
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	环腺苷一磷酸
CCB	central cell bank	中心细胞库（主细胞库）
CCD	charge-coupled device	电耦联器
CCM	complete culture medium	完全培养基
CCTV	closed-circuit television	闭路电视
CDC	Centers for Disease Control	疾病预防控制中心
CDK	cyclin-dependent kinase	周期蛋白依赖性激酶
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CE	cloning efficiency	克隆效率
CEA	carcinoembryonic antigen	癌胚抗原
CFC	colony-forming cell	集落形成细胞
CFC-GEMM	granulocyte, erythrocyte, macrophage, and megakaryocyte colony-forming cell	粒细胞、红细胞、巨噬细胞、巨核细胞集落形成细胞
CFC-mix	mixed colony-forming cell	混合集落形成细胞
CFU	colony-forming unit	集落形成单位；菌落形成单位
CFU-GEMM	CFU for granulocyte, erythrocyte, macrophage, and megakaryocyte colony-forming cell	粒细胞、红细胞、巨噬细胞和巨核细胞集落形成细胞的集落形成单位
CHO	Chinese hamster ovary (cell line)	中国仓鼠卵巢（细胞系）
Ci	Curie	居里（放射强度单位）
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤
CK	creatine kinase	肌酸激酶
CL	cervical loop	颈袢
CM	conditioned medium	条件培养基
CMC	carboxymethylcellulose	羧甲基纤维素
CMF	calcium-and magnesium-free saline	无钙镁盐水
CML	chronic myeloid leukemia	慢性髓细胞（性）白血病
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories	康诺特医学研究实验室
CNS	central nervous system	中枢神经系统
CNTF	ciliary neurotropic factor	睫状神经营养因子
COG	cost of good	产品成本
COSMIC	Catalogue of Somatic mutations in Cancer (UK)	癌症体细胞突变编目（英国）
CSC	cancer stem cell	肿瘤干细胞
CSF	colony-stimulating factor	集落刺激因子
C×T	concentration multiplied by time	浓度乘以倍数

CTC	collagenase, trypsin and chick serum	胶原酶、胰蛋白酶和鸡血清
DAF	diacetyl fluorescein	二乙酰荧光素
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole	4′,6-二氨基-2-苯基吲哚
dATP	deoxyadenosine triphosphate	脱氧腺苷三磷酸
DBSS	dissection BSS	解剖（用）BSS
DCS	donor calf serum	供体小牛血清
dCTP	deoxycytidine triphosphate	脱氧胞苷三磷酸
DEFRA	Department for Environment, Food & Rural Affairs	（英国）环境、食品和农村事务部
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DESC	dental epithelial stem cell	口腔上皮干细胞
dGTP	deoxyguanosine triphosphate	脱氧鸟苷三磷酸
DIC	differential interference contrast	微分干涉相差
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium	Dulbecco 改良的 Eagle 培养基
DMF	dimethyl formamide	二甲基甲酰胺
DMSO	dimethyl sulphoxide	二甲基亚砜
DNA	desoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DO	dissolved oxygen	溶解氧
DoH	Department of Health (UK)	卫生部（英国）
dpc	days post coitum	交配后天数
D-PBSA	Dulbecco's phosphate-buffered saline solution A (without Ca^{2+} and Mg^{2+})	Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液 A（无 Ca^{2+}、Mg^{2+}）
D-PBSB	Dulbecco's phosphate-buffered saline solution B (Ca^{2+} and Mg^{2+})	Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液 B（含 Ca^{2+}、Mg^{2+}）
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)	德国微生物菌种保藏中心
DW	deionized water	去离子水
DT	population doubling time	群体倍增时间
dTTP	deoxythymidine triphosphate	三磷酸脱氧胸苷
DX	dexamethasone	地塞米松
EBRA	European Biomedical Research Association	欧洲生物医学研究学会
EBSS	Earle's balanced salt solution	Earle 平衡盐溶液
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
EC	embryonal carcinoma; European Community	胚胎性癌；欧洲联盟
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures(now European Collection of Cell Cultures)	欧洲动物细胞收集中心（现欧洲细胞培养收集中心）
ECGF	endothelial cell growth factor	内皮细胞生长因子
ECGS	endothelial cell growth supplement	内皮细胞生长补充物

ECM	extracellular matrix, usually in the context of that formed by a preexisting monolayer	细胞外基质，通常由预先的单层所形成
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Method	欧洲替代方法验证中心
EDL	extensor digitorum longus (muscle)	趾长伸肌
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	乙二醇四乙酸
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm (mouse sarcoma)	EHS 小鼠肉瘤
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
EM	electron microscope	电子显微镜
EMA	epithelial membrane antigen	上皮膜抗原
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮间充质转化
Epo	erythropoietin	（促）红细胞生成素
ES	embryonic stem(as in embryonic stem cell)	胚胎干（如胚胎干细胞）
ESC	embryonic stem cell	胚胎干细胞
EtOH	ethanol	乙醇
FACS	fluorescence-activated cell sorter	荧光激活细胞分选仪
FAD	（1） flavin-adenine dinucleotide （2） high-calcium medium for (keratinocyte) cultures with feeder layers	（1）黄素腺嘌呤二核苷酸 （2）高钙培养基加饲养层培养角质细胞
FASTA	fast-all-single letter coding for nucleotides and amino acid	核苷酸和氨基酸的高速单字母编码
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCS	fetal calf serum	小牛血清
FDA	Federal Drug Administration (USA)	食品药品监督管理局（美国）
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
FGFR	FGF receptor	FGF 受体
FHI	fetal human intestinal (cells)	人胚小肠（细胞）
FISH	fluorescence *in situ* hybridization	荧光原位杂交
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FNC	fibronectin-collagen	纤连蛋白-胶原蛋白
FPG	fluorescence plus Giemsa	荧光加吉姆萨
G_1	gap one (of the cell cycle)	间期 1（细胞周期）
G_2	gap two (of the cell cycle)	间期 2（细胞周期）
g	radial acceleration relative to gravity	重力相关径向加速度
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
GABA	γ-aminobutyric acid	γ-氨基丁酸
Gal-C	galactocerebroside	半乳糖脑苷酸
GCCP	good cell culture practice	良好细胞培养规范

G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	粒细胞集落刺激因子
GFAP	glial fibrillary acidic protein	胶质纤维酸性蛋白
GFOGER	glycine-phenylalanine-pyrrolysine-glycine-glutamic acid-arginine	甘氨酸-苯丙氨酸-吡咯赖氨酸-甘氨酸-谷氨酸-精氨酸
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GFR	growth factor reduction (or reduced)	生长因子减少（或降低的）
GLP	good laboratory practice	良好实验室规范
GM-CFC	granulocyte and macrophage colony-forming cell	粒细胞和巨噬细胞集落形成细胞
GM-CSF	granulocyte and macrophage colony stimulating factor	粒细胞和巨噬细胞集落刺激因子
GMEM	Glasgow modification of Eagle's Minimum Essential Medium	格拉斯哥改良的 Eagle MEM 培养基
GMP	good manufacturing practice	良好操作规范
GRGDS	glycine-arginine-glycine-aspartate-serine	甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸
HARV	high-aspect-ratio vessel	高方位生物反应容器
H&E	hematoxylin and eosin	苏木素伊红
HAT	hypoxanthine, aminopterin and thymidine	次黄嘌呤氨基酸蝶呤、胸腺嘧啶和脱氧核苷
HBS	HEPES buffered saline	HEPES 缓冲盐水
HBSS	Hanks' balanced salt solution	Hanks 平衡盐溶液
HC	hydrocortisone	氢化可的松，皮质醇
HCE	human corneal epithelium	人角膜上皮
HCEC	human cardiac endothelial cell	人心内皮细胞
hCG	human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HECREC	Hospital Research Ethics Committee	医院研究伦理委员会
HEPA	high-efficiency particulate air (filter)	高效微粒空气过滤器
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸
hES(C)	human embryonic stem (cell)	人胚胎干（细胞）
HFEA	Human Fertilisation and Embryology Authority (UK)	人工授精与胚胎学管理局（英国）
HFIP	hexafluoro-2-propanol	六氟异丙醇
HGF	hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子
HGPRT	hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transferase	次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HIBS	heat-inactivated bovine serum	热灭活小牛血清
HIF	hypoxia-inducible factor	低氧诱导因子
HITES	hydrocortisone, insulin, transferrin, estradiol and selenium	氢化可的松、胰岛素、转铁蛋白、雌二醇和硒
HIV	human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒

HLA	human leucocyte antigen	人白细胞抗原
HMBA	hexamethylene-bis-acetamide	环六亚甲基双乙酰胺
HMFG	human milk fat globule	人乳脂肪小体
HPA	Health Protection Agency (UK)	健康保护局（英国）
HPV	human papilloma virus	人乳头状瘤病毒
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HS	horse serum	马血清
HSC	hemopoietic stem cell	造血干细胞
HSE	Health and Safety Executive (UK)	健康和安全执行委员会（英国）
HSM	high-serum medium	高血清培养基
HSPG	heparin sulfate proteoglycan	硫酸类肝素蛋白聚糖
HSRRB	Health Science Research Resources Bank	健康科学研究资源库
HSV	herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
HT	Hypoxanthine/thymidine	次黄嘌呤/胸腺嘧啶脱氧核苷
HTA	Human Tissue Authority (UK)	人体组织管理委员会（英国）
HT Act	Human Tissue Act (UK)	人体组织条例（英国）
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	人端粒酶反相转录酶
hUC-MSC	human umbilical-cord derived mesenchymal stem cell	人脐带源间充质干细胞
HuS	human serum	人血清
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	人脐静脉内皮细胞
HVJ	hemagglutinating virus of Japan	日本血凝病毒
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee	公共动物管理和使用委员会
IATA	International Air Transport Authority	国际航空运输协会
ICAM	intercellular adhesion molecule	细胞间黏附分子
ICLAC	International Cell Line Authentication Committee	国际细胞系鉴定委员会
ICM	inner cell mass (of embryo)	内细胞团（胚胎）
IL-1,2, etc.	interleukin-1, 2, etc.	白细胞介素-1、2，等
IMDM	Iscove's modification of DMEM	Iscove 改良的 DMEM
INT	iodonitrotetrazolium	碘硝基四唑
IPA	isopropyl alcohol	异丙醇
iPSC	induced pluripotent stem cell	诱导的多能干细胞
IRAS	Integrated Research and Application System (UK)	综合研究应用系统（英国）
IRB	Institutional Review Board (USA)	伦理审查委员会（美国）
ITS	insulin, transferrin, selenium	胰岛素、转铁蛋白、硒
IVF	*in vitro* fertilization	体外受精
JCRB	Japanese Collection of Biological Research Bioresources	日本生物资源研究收集中心
KBM	keratinocyte basal medium	角质形成细胞基础培养基
kb	kilobase pairs (in DNA)	千碱基对（DNA）

KDM	keratinocyte-defined medium	角质形成细胞已知成分培养基
KGF	keratinocyte growth factor	角质形成细胞生长因子
KGM	keratinocyte growth medium	角质形成细胞生长培养基
LCL	lymphoblastoid cell line	成淋巴细胞样细胞系
LDA	limiting dilution analysis	有限稀释分析
LDF	Leibowitz-DMEM-F12 (medium)	Leibowitz-DMEM-F12（培养基）
LD	lactate dehydrogenase; lethal dose	乳酸脱氢酶；致死剂量
LI	labeling index	标记指数
LIF	leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
LL	leukemia/lymphoma	白血病/淋巴瘤
LN_2	liquid nitrogen	液氮
LRR	leucine-rich repeat	富亮氨酸重复单位
LSC	leukemia stem cell	白血病干细胞
LTBMC	long-term bone marrow culture	骨髓长期培养
LTC-IC	long-term culture initiating cell	长期培养起始细胞
M199	medium 199	199 培养基
mol (M)	molar	摩尔
mmol (mM)	millimolar	毫摩尔
μmol (μM)	micromolar	微摩尔
mAb	monmclonal antibody	单克隆抗体
MAC	mammalian artificial chromosomes	哺乳动物人工染色体
MACS	magnet-activated cell sorting	磁激活细胞分类
MAP	mitogen-activated protein (kinase)	有丝分裂原激活蛋白（激酶）
MCB	master cell bank	主细胞库，中心细胞库
MCDB	Molecular, Cellular and Developmental Biology (Department of University of Colorado, Boulder, USA)	分子、细胞和发育生物学（美国博尔德科罗拉多大学学院）
MCEC	murine cardiac endothelial cell	小鼠心脏内皮细胞
MD	malate dehydrogenase	苹果酸脱氢酶
MDCK	Madin-Darby canine kidney (cell line)	MD 犬肾（细胞系）
MEF	mouse embryo fibroblast	小鼠胚胎成纤维细胞
MEM	minimal essential medium (Eagle)	极限必需培养基（Eagle）
MeOH	methanol	甲醇
mESC	mouse embryonic stem cell	小鼠胚胎干细胞
MHC	major histocompatibility	主要组织相容性
MHSM	modified high-salt medium	改良的高盐培养基
MPI	mannose-6-phosphate isomerase	甘露糖-6-磷酸异构酶
mPES	modified polyethersulfone	改性聚醚砜
MRA	mycoplasma removal agent	支原体去除剂
MRC	Medical Research Council (UK)	医学研究委员会（英国）

MRI	magnetic resonance imaging	磁共振成像
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
MSC	mesenchymal stem cell	间充质干细胞
MSCGM	mesenchymal stem cell growth medium	间充质干细胞生长培养基
MT	microtitration	微滴定（法）
MST	maximal serial transfer	最大系列转移（培养）
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	二甲基噻嗪二苯基四唑溴盐，噻唑蓝
MTX	methotrexate	氨甲蝶呤
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（辅酶 I ）
NASA	National Aeronautics and Space Administration	美国宇航局
NAT	noradrenalin transporter	去甲肾上腺素运载蛋白
NBCS	newborn-calf serum	新生牛血清
NCAM	neural cell adhesion molecule	神经细胞黏附分子
NCBI	National Center for Biotechnology Information	国家生物技术信息中心
NCI	National Cancer Institute	美国国家癌症研究所
NEAA	nonessential amino acid	非必需氨基酸
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
NHBE	normal human bronchial epithelium(al)	正常人支气管上皮（的）
NHS	（1）National Health services (UK) （2）*N*-hydroxysulfosuccinimide	（1）国家医疗服务（英国） （2）*N*-羟基琥珀酰亚胺
NICE	National Institute for Clinical Excellence (UK)	国家卓越临床研究中心（英国）
NIH	National Institutes of Health (USA)	国家卫生研究院（美国）
NIH OBA	NIH Office of Biotechnology Activities	NIH 生物技术活动办公室
NIH ORS	NIH Office of Research Services	NIH 研究服务办公室
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health	国家职业安全和健康研究所
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
NRC	National Research Council (USA)	国家研究委员会（美国）
NRES	National Research Ethics Service (UK)	国家科研伦理服务（中心）（英国）
NS	neurospheres	神经球
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma	非小细胞肺癌
NSF	National Science Foundation (USA)	国家科学基金（美国）
OD	optical density	光密度
OEC	olfactory ensheathing cell	嗅鞘细胞
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	经济合作与发展组织
OGTR	Office of Gene Technology Regulator (Australia)	基因技术管理办公室（澳大利亚）
OHRP	Office for Human Research Protection (USA)	人类研究防护署（美国）
OHS	Occupational Health and Safety	职业卫生和安全

OSHA	Occupational Safety and Health Administration (USA)	职业安全和健康管理局（美国）
OLAW	Office for Laboratory Animal Welfare (USA)	实验室动物福利署（美国）
OM	organoid medium	类器官培养基
OPC	oligodendrocyte precursor cell	少突胶质细胞前体细胞
ORS	outer root sheath	外根鞘
PA	plasminogen activator	纤溶酶原激活物
PAEC	porcine aortic endothelial cell	猪主动脉内皮细胞
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PALM	photoactivation localization microscopy	光活化定位显微镜术
PAP	peroxidase-antiperoxidase	过氧化酶-抗过氧化酶
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PBSA	phosphate-buffered saline, solution A (without Ca^{2+} and Mg^{2+})	磷酸缓冲盐溶液，溶液 A（无 Ca^{2+}、Mg^{2+}）
PBSB	phosphate-buffered saline, solution B (Ca^{2+} and Mg^{2+})	磷酸缓冲盐溶液，溶液 B（含 Ca^{2+}、Mg^{2+}）
PCA	perchloric acid	过氯酸
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖性细胞核抗原
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PCSBI	Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues (USA)	生物伦理问题研究总统委员会（美国）
PCV	packed cell volume	密实的细胞体积
PD	population doubling	群体倍增
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板衍生的生长因子
PDMS	polydimethylsiloxane	聚二甲基硅氧烷
PDT	population-doubling time	群体倍增时间
PE	（1）pituitary extract	（1）垂体提取物
	（2）PBSA/EDTA (trypsin diluent)	（2）PBSA/EDTA（胰蛋白酶稀释剂）
	（3）plating efficiency (in clonogenic assays)	（3）贴瓶率（克隆形成实验）
PEG	poly(ethylene glycol)	聚乙二醇
PEGDA	PEG diacrylate	PEG 二丙烯酸盐
Pep B	peptidase B	肽酶 B
PES	polyethersulfone	聚醚砜
PET	poly(ethylene terephthalate)	聚乙烯对苯二酸盐
PGA	poly(glycolic acid)	聚乙醇酸
PGR	proteoglycan receptor	蛋白聚糖受体
PHA	phytohemagglutinin	植物凝集素
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PLA	poly(lactic acid)	聚乳酸
PLD	phospholipase D	磷脂酶 D

PLL	poly-L-lysine	聚-L-赖氨酸
PMA	phorbol myristate acetate	豆蔻酸佛波醇乙酸酯
PMMA	poly(methyl methacrylate)	聚甲基丙烯酸甲酯
PPLO	pleuropneumonia-like organism (mycoplasma)	类胸膜肺炎菌（支原体）
PrEGM	prostatic epithelial growth medium	前列腺上皮生长培养基
PSA	prostate-specific antigen	前列腺特异抗原
P-SC	prostate stem cell	前列腺干细胞
PTFE	polytetrafluoroethylene	聚四氟乙烯，特氟隆
PVC	poly(vinyl chloride)	聚氯乙烯
PVP	polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PWM	pokeweed mitogen	商陆促细胞分裂原
QA	quality assurance	质量保证
QC	quality control	质量控制
QF-PCR	quantitative fluorescence PCR	定量荧光 PCR
RBC	red blood cell	红血细胞
RCCS™	Rotatory Cell Culture System™	旋转式细胞培养系统™
REC	Research Ethics Committee (UK)	研究伦理委员会（英国）
RFLP	restriction-fragment-length polymorphisms	限制性片段长度多态性
RGD	arginyl-glycyl-aspartic acid	精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
RITC	rhodamine isothiocyanate	异硫氰酸罗丹明
RO	reverse osmosis (ROW= reverse osmosis water)	反渗透（ROW=反渗透水）
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNP	ribonucleoprotein	核糖核蛋白
ROCK	rho (ρ)-associated coiled kinase	rho(ρ)相关的螺旋激酶
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	罗斯威尔派克纪念研究所
RSPCA	Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals(UK)	皇家防止虐待动物协会（英国）
RT-PCR	reverse transcriptase PCR	反转录酶 PCR
S	DNA synthetic phase of cell cycle	细胞周期的 DNA 合成期
SBTI	soybean trypsin inhibitor	大豆胰蛋白酶抑制剂
SC	stem cell	干细胞
SCC	squamous cell carcinoma	鳞状细胞癌
SCE	sister chromatid exchange	姊妹染色单体交换
SCF	stem cell factor	干细胞因子
SCID	severe combined immunodeficiency	严重联合免疫缺陷
SCLC	small-cell lung carcinoma	小细胞肺癌
SD	saturation density	饱和密度
SDS	sodium dodecyl sulfate (=sodium lauryl sulfate)	十二烷基硫酸钠（月桂基硫酸钠）
SEM	scanning electron microscope	扫描电子显微镜

SGM	second-generation multiplex	次代倍数
SHED	stem cell from human exfoliated deciduous teeth	脱落人乳齿干细胞
SIT	selenium, insulin, transferrin	硒、胰岛素、转铁蛋白
SIVB	Society for *in Vitro* Biology	体外生物学协会
SKDM	supplemented keratinocyte-defined medium	补加角质细胞合成培养基
SLR	single-lens reflex (camera)	单镜头反光（照相机）
SLS	sodium lauryl sulfate (=sodium dodecyl sulfate)	月桂基硫酸钠（十二烷基硫酸钠）
SLTV™	Slow Turning Lateral Vessel™	旋转式 Later 容器 ™
SMCM	smooth-muscle cell medium	平滑肌细胞培养基
S-MEM	MEM with low Mg^{2+} and no Ca^{2+}	低 Mg^{2+}、无 Ca^{2+}的 MEM
SNP	single-nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SOP	standard operating procedure	标准操作程序
SPDP	*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (25Su-104)	*N*-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯（25Su-104）
SPW	semi-purified water	半纯水
SSC	sodium citrate/sodium chloride	柠檬酸钠/氯化钠
SSM	serum-supplemented medium	含血清培养基
ssmAb	stereospecific monoclonal antibody	立体特异性单克隆抗体
SST	stereospecific targeting (hybridoma technique)	立体特异性打靶（杂交瘤技术）
STLV	slow-turning lateral vessel™	慢旋式 Later 容器 ™
STR	（1）short tandem repeat (in DNA analysis) （2）stirred-tank reactor(used in scale-up)	（1）短串联重复序列（DNA 分析） （2）搅拌罐反应器（用于扩增）
SUB	single use bioreactor	单用途生物反应器
Sulpho-NHS	*N*-hydroxysulfosuccinimide	羟基硫代琥珀酰亚胺
SV40	simian virus 40	猿猴病毒 40
SV40LT	*SV40* gene for large T-antigen	大 T 抗原的 *SV40* 基因
TA	tibialis anterior	胫骨前肌
TAE	Tris base+acetic acid+EDTA	TAE 缓冲液
TAME	*p*-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester	*p*-甲苯-磺酰基-L-精氨酸甲酯
TAP	The Automation Partnership (UK)	自动化合营公司（英国）
TBSS	Tyrode's balanced salt solution	台氏平衡盐溶液
TC	tissue culture	组织培养
TCA	trichloroacetic acid	三氯乙酸
T_D	population doubling time	群体倍增时间
TDLU	terminal ductal lobular unit	终端导管小叶单位
TE	trypsin/EDTA	胰蛋白酶/EDTA
TEB	Tris/EDTA buffer	Tris/EDTA 缓冲液
TEER	transepithelial electrical resistance	穿上皮电阻
TERT	telomerase reverse transcriptase	端粒酶反相转录酶
TGF	transforming growth factor	转化生长因子

TK	thymidine kinase	胸腺嘧啶脱氧核苷激酶
TLM	telomere lengthening mechanism	端粒延长机制
TMB	tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TOC	total organic carbon	总有机碳
TPA	tetradecanoylphorbol acetate	十四烷酰佛波醇乙酯
t-PA	tissue plasminogen activator	组织纤溶酶原激活物
TPX	polymethylpentene	聚甲基戊烯
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TNF 相关凋亡诱导配体
TS	temperature-sensitive	温度敏感的
TSE	transmissible spongiform encephalopathy	传染性海绵状脑病
TSH	thyroid-stimulating hormone	促甲状腺激素
TVP	trypsin, versene, phosphate	胰蛋白酶、依地酸、磷酸盐
U	unit(s)	单位
UHP	ultrahigh purity	超高纯
USDA	United States Department of Agriculture	美国农业部
USNRC	United States Nuclear Regulatory Commission	美国核管理委员会
u-PA	urokinase-like plasminogen activator	尿激酶型纤溶酶激活物
UPW	ultrapure water	超纯水
USD	US dollar($)	美元（$）
USP	*United States Pharmacopoeia*	《美国药典》
UV	ultraviolet	紫外线
VDU	visual display unit	视觉显示装置
VIP	vasoactive intestinal peptide	血管活性肠肽
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
WBC	white blood cell	白细胞
WCB	working cell bank	运作细胞库
WMA	World Medical Association	世界医学协会
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide	2,3-双-(2-甲基-4-硝基- 5-磺苯基)-2H-四唑-5-羟基酰苯胺
ZEF	zebrafish embryo fibroblast	斑马鱼胚胎成纤维细胞

（章静波　译）

目　录

* 本书附录Ⅲ及附录Ⅳ请扫描二维码在“多媒体”栏目中获取。

图片目录

表格目录

方案目录*

* 本书补充方案请扫描二维码从“多媒体”栏目获取。

短篇综述目录



彩版目录



第1章

绪　论

从各种不同展现形式看，组织培养迄今已有100多年的历史。随着技术的演进，可以将其划分出3个各具特征的时期：①第一期，大约前40年，主要内容是表述和研究由Harrison、Carrel等开创的外植物（explant）外向生长（outgrowth）的细胞行为（Harrison，1907；Carrel，1912）；②第二期，第50~60年，致力于建立细胞系（cell line），包括有限细胞系，诸如WI-38（Hayflick and Moorhead，1961）和MRC-5（Jacob，1970），以及连续细胞系，诸如L细胞（Earle et al.，1943）、HeLa细胞（Gey et al.，1952）和许多其他细胞系；③第三期，即当代时期，探索细胞系和新分离细胞的基因表达，并对它们进行分析和操纵。原本只有少数人从事的组织培养领域，从探索性研究到使细胞在体外生长，如今它已成为细胞和分子生物学、病毒学、细胞病理学、生物工程及大规模的早年人们从不敢想象的工业制药学的主要工具。

随着对转录因子对基因表达所起作用的认识的巨大进展，如今人们已能对常用的和容易培养的细胞，诸如成纤维细胞施行遗传操纵，并将它们转变成为多能干（iPS）细胞，它们能分化成为众多不同的细胞类型（Lewitzky and Yamanaka，2007；Nakagawa et al.，2007；Yu et al.，2007），除了胚胎之外，还可以从许多不同组织中分离出干细胞。加之可引起基因组转录改变的化学诱导物，如丙戊酸（valproic acid）的运用，如今用表观遗传操纵，而非遗传学干预即可产生iPS细胞。现已证明，通过前体细胞的回复（Kondo and Raff，2000；le Douarin et al.，2004），有可能将一个细胞谱系分化成为另一个细胞谱系，甚至还可以使细胞不必回复至原始的细胞时转变其谱系（Vierbuchen et al.，2010），这一现象是许多年前对再生现象观察时提出来的（Pritchard et al.，1978；Dkada，1983）。因此，有关分化为不可逆定向于某一特定途径的概念需重新予以审视。这些发展的含义是十分深远的，人们不再需要使用复杂的筛选培养技术，而是运用简单的细胞培养程序即可起始一个细胞系，如用表观遗传操纵，直接地，或通过回复至干细胞或其他祖细胞，便可将它转变成为一个新的表型。这一技术使得人们能够进行分化调控研究，确定异常分化（Ebert et al.，2009）和肿瘤复制中的差错。从目前已知的病理学角度用细胞系创建疾病的诊断筛选系统和开发药物，以及通过组织工程进行自体移植等。所有这些，有如20世纪生物技术的兴起那样，大大拓宽了组织培养技术及其应用。

在过去的50年里，建立细胞系在细胞培养进展中最为突出，但也带来诸多未曾预见的问题，人们观察到培养细胞会失去它们的分化性质，这使得早期的研究者警觉到其中存在去分化

（dedifferentiation）和选择性（selectin）问题。事实上，培养细胞在遗传上及表型方面可能都具有不确定性。不能预见的是，细胞系的世代交替有可能：①为支原体（mycoplasma）的生长提供理想的基质；②增加了交叉污染（cross-contamination）的风险，从而使得微生物学家原本熟悉的鉴别变得困难。尽管20世纪60年代人们已认识到这两个问题，但常被忽视。当今细胞培养者已不再为此困扰，因为之后的不少专题强调必须有良好细胞培养规范（Balls et al.，2006；Geraghty et al.，2014），以及强调要有严格的质量控制以减少微生物污染、错误鉴定和交叉污染。

1.1 历史背景

组织培养是在20世纪初（Harrison，1907；Carrel，1912）（表1.1）创建的一种研究动物细胞的行为方法，为的是避开正常体内自体调节及实验条件应激所可能产生的机体整体因素的影响。顾名思义，本技术最初是以未离散的组织小块进行操作的，其生长也只局限于从组织小块呈放射状迁移出来的细胞，偶尔也可观察到外长细胞的有丝分裂。由于来自这种原始外植块的细胞培养方法维系长达50多年（Fischer，1925；Parker，1961），因此，“组织培养”（tissue culture）一词作为一个通用术语一直沿用至今，尽管事实上自20世纪后半叶（图1.1），本领域中大多数突破性进展所采用的方式可能均为分散性的培养细胞。

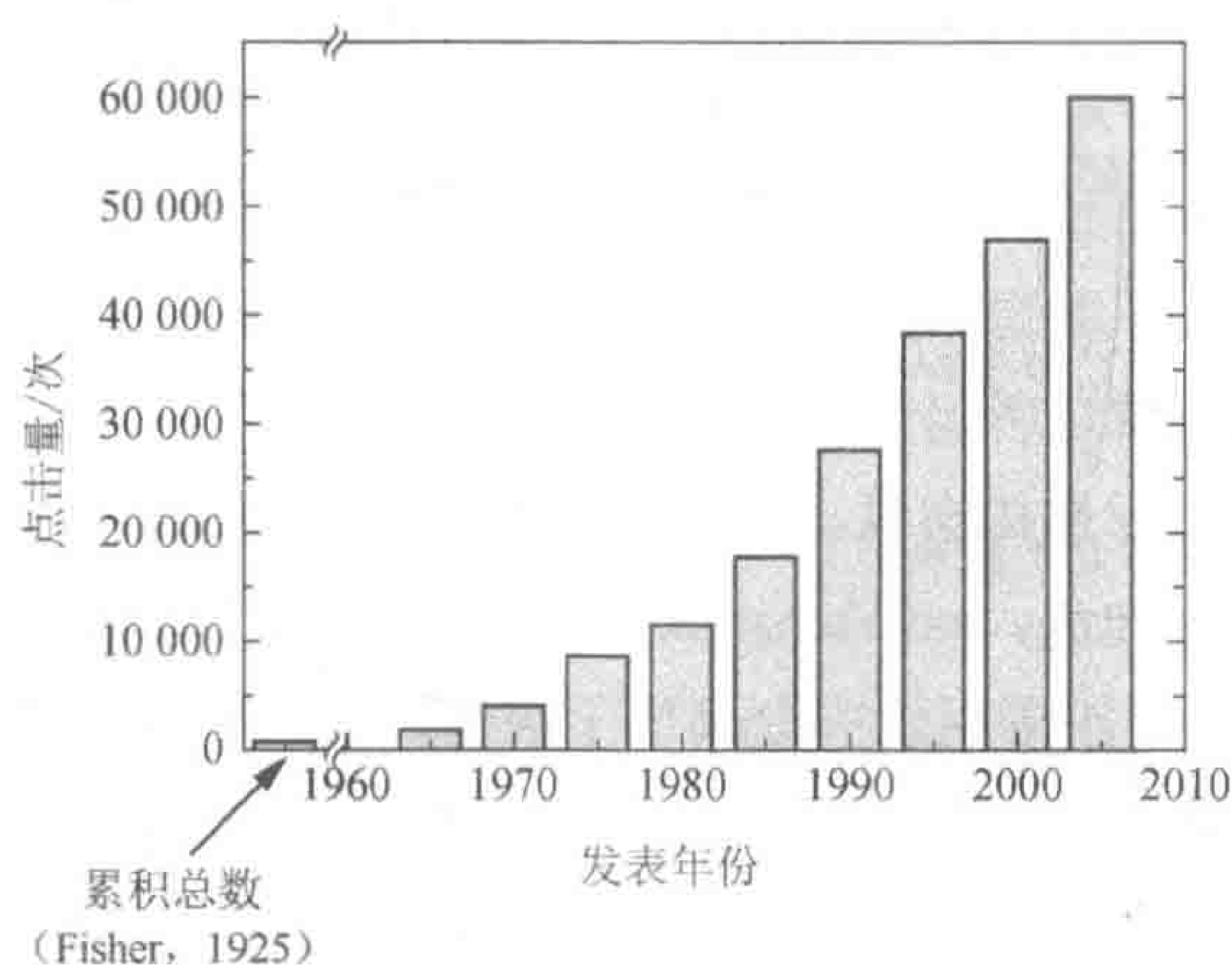


图1.1 组织培养的发展。自1965年以来，“细胞培养”在PubMed的点击量。1960年之前的数字源自Fisher（1925）的书目

Rous最早证明外植细胞可以分离开来，而且这种分散的细胞随后可以铺展（Rous and Jones，1916），虽然当时Fisher、Carrel及其他研究者更常用的是利用外科手术分离培养细胞进行传代，并因此得到之后所称的细胞株（cell strain）。L929是最早克隆的细胞株，它是用毛细管克隆技术（capillary cloning）从小鼠L细胞中分离获得的（Sanford et al.，1948）。直至20世纪50年代胰蛋白酶（trypsin）才较普遍地用于细胞传代，接着Dulbecco（1952）介绍了为进行病毒噬斑实验而推行的单层传代培养和通过胰蛋白酶消化法（trypsinization）得到单个细胞悬液，后者十分有利于单个细胞克隆技术的进一步发展。Gey等（1952）建立了第一个连续的人细胞系，即HeLa细胞。

表 1.1 细胞和组织培养发展过程中的技术发明

年代	事件	参考文献
1907	蛙胚神经纤维的原代外植和体外生长	Harrison，1907
1912	鸡结缔组织的原代外植块培养；心肌收缩达 2~3 个月	Carrel，1912；Burrows，1912
1916	胰蛋白酶消化和外植块传代	Rous and Jones，1916
1923	成纤维细胞系传代	Carrel and Ebeling，1923
1925，1926	胚胎组织在器官培养中分化	Strangeways and Fell，1925，1926
1928	细胞行为的定时记录	Canti，1928
1929	鸡长骨的器官培养	Fell and Robison，1929
1941	胰蛋白酶应用于皮肤和心脏的原代培养	Medawar，1941
1943	小鼠成纤维 L 细胞系建立；第一个连续细胞系	Earle et al.，1943
1948	抗生素引入组织培养	Keilova，1948；Cruikshank and Lowbury，1952
	L 细胞毛细管克隆化	Sanford et al.，1948
1949	病毒在细胞培养中生长	Enders et al.，1949
1952	用胰蛋白酶分散胚胎组织	Moscona，1952
	分散细胞重聚成 3D 培养用于分化研究的重要性	Moscona and Moscona，1952
	胰蛋白酶用于复制传代	Dulbecco，1952
	胰酶消化制备的原代培养的鸡胚成纤维细胞用于病毒噬斑实验	Dulbecco，1952
	从宫颈癌中建立第一个人细胞系 HeLa	Gey et al.，1952
1953	用猴肾细胞培养脊髓灰质炎病毒	Farrell et al.，1953
1954	用定时电影照相术证明成纤维细胞运动的接触抑制	Abercrombie and Heaysman，1953，1954
1955	在同源饲养层上克隆化 HeLa 细胞	Puck and Marcus，1955
	合成培养基问世	Eagle，1955，2009
	合成培养基需要血清生长因子	Sanford et al.，1955；Harris，1959
	Salk 脊髓灰质炎疫苗在猴肾细胞中生长	Salk，1955；Kew et al.，2005
1956	在滤膜孔气-液界面间充质跨膜诱导肾小管	Grobstein，1956
1950~1960	认识到支原体（PPLO）感染的重要性	Coriell et al.，1958；Rothblat and Morton，1959；Nelson，1960
1960	核移植	Briggs and King，1960；Gurdon，1960
1961	正常人细胞有限生命期定义	Hayflick and Moorhead，1961
	细胞融合-体细胞杂交	Sorieul and Ephrussi，1961
1962	BHK21 的建立和转化	Macpherson and Stoker，1962
	（垂体和肾上腺肿瘤）在培养中分化的维持	Buonassisi et al.，1962；Yasamura et al.，1966；Sato and Yasamura，1966

续表

年代	事件	参考文献
1963	肿瘤细胞大规模悬浮培养	Moore et al.，1963
	3T3细胞和自发性特化	Todaro and Green，1963
	在器官培养中心脏间充质细胞诱导初生肝的分化	le Douarin，1963
1964	胚胎干细胞的多能性	Kleinsmith and Pierce，1964
	在琼脂上选择转化细胞	Macpherson and Montagnier，1964
	用旋转瓶进行大量培养	Polatnick and Bachrach，1964
1964~1969	用WI-38人肺成纤维细胞生产狂犬病流行性腮腺炎和风疹疫苗	Wiktor et al.，1964；Sokol et al.，1968
1965	中国仓鼠卵巢细胞无血清克隆化	Ham，1965
	异核体细胞——人-小鼠杂种细胞	Harris and Watkins，1965
1966	神经生长因子的纯化	Levi-Montalcini，1966
	大鼠肝细胞癌的分化及酶适应	Thompson et al.，1966
	氢化可的松和细胞相互反应在神经视网膜分化中的作用	Moscona and Piddington，1966
	造血细胞的集落形成	Bradley and Metcalf，1966；Ichikawa et al.，1966
1967	表皮生长因子的纯化	Hoober and Cohen，1967
	HeLa细胞交叉污染的证明	Gartler，1967
	细胞增殖的密度限制	Stoker and Rubin，1967
	成淋巴样细胞系的分离	Moore et al.，1967；Gerper et al.，1969；Miller et al.，1971
1968	培养的正常成肌细胞保持分化状态	Yaffe，1968
	停泊非依赖性的细胞增殖	Stoker et al.，1968
	在胶原包被的纤维素海绵中的3D生长	Leighton et al.，1968
1969	用胶原酶和透明质酸酶灌注分散肝细胞	Berry and Friend，1969
	证明造血细胞中的克隆形成需要集落刺激因子	Metcalf，1969，1990
	癌基因是癌的决定子	Huebner and Todaro，1969
20世纪70年代	用于细胞培养的层流超净台问世	Kruse et al.，1991；Collins and Kennedy，1999
1970	高密度灌注培养	Kruse et al.，1970
1971	小鼠表皮角质形成细胞培养	Fusenig，1971
1972	中空纤维的灌注培养	Knazek et al.，1972
	细胞贴附塑料膜上的大量培养	House，1972
	用胶原酶消化的肝细胞原代培养	Leffert and Paul，1972
1973	mRNA和基因转录调控	Darnel et al.，1973

续表

年代	事件	参考文献
1973	用磷酸钙进行 DNA 转移	Graham and Van der Eb，1973
1974	小鼠神经分泌细胞的克隆	de Vitry et al.，1974
	成纤维细胞生长因子的分离	Gospodarowicz，1974；Gospodarowicz and Moran，1974
1975	用杂交瘤生产单克隆抗体（小鼠-脾细胞杂交体）	Kohler and Milstein，1975
1976	胚胎干细胞全能性	Illmensee and Mintz，1976
	补充生长因子的无血清培养基	Hayashi and Sato，1976
1977	用甲基纤维素进行悬浮克隆化	Dao et al.，1977
	证实乳腺肿瘤细胞系被 HeLa 细胞交叉污染	Nelson-Rees and Flandermeyer，1977
	3T3 饲养层和皮肤培养	Green，1977
	用 DNA 荧光检测支原体	Chen，1977
	在 3T3 细胞饲养层上培养角质形成细胞	Green，1977
	细胞外基质胶原对腱细胞分化的作用	Schwartz and Bissell，1977
1978	胶原基质对肝细胞分化的重要性	Sattler et al.，1978
	MCDB 选择性无血清培养基	Ham and McKeehan，1978
	证明基质相互作用对细胞生长和分化的重要性	Gospodarowicz et al.，1978；Reid and Rojkind，1979
	细胞形状和生长控制	Folkman and Moscona，1978
	体外侵袭试验	Hart and Fidler，1978
1979	体外模拟癌侵袭	Mareel et al.，1979
1980	从 EHS 肉瘤提取基质（后来为 Matrigel^{TM}）	Hassell et al.，1980
1980~1987	开发用于特殊细胞系的选择性培养基	Peehl and Ham，1980；Hammond et al.，1984；Knedler and Ham，1987
1981	Tfm 小鼠器官培养证明雄激素通过间充质对前列腺发育起作用	Cunha，1973
	广泛交叉感染的检测	Nelson-Rees et al.，1981
1982	基因表达调控	Darnell，1982（e.g）
1983	利用可渗透支持物证明分化的甲状腺上皮的极性	Chambard et al.，1983
	细胞周期调控；细胞周期蛋白	Evans et al.，1983；Nurse，1990
	SV40 引起的永生化	Huschtscha and Holliday，1983
	重组的皮肤培养物	Bell et al.，1983
	用杆状病毒将 DNA 转入昆虫细胞	Smith et al.，1983
1984	胞外基质在乳腺上皮细胞分化中的作用	Lee et al.，1984
	在哺乳动物细胞中生产重组组织型纤溶酶原激活物	Collen et al.，1984
1987	用电穿孔将 DNA 转入至培养细胞中	Chu et al.，1987

续表

年代	事件	参考文献
1987	在基质包被的滤膜上进行侵袭试验	Hendrix et al.，1987
1989	基质在调节生长与分化中的作用	Ingber and Folkman，1989
1990	反转录病毒转移	Miller et al.，1990
20 世纪 90 年代	利用转化细胞的工业化规模培养生产生物药物	Butler，1991
1991	人成体间充质干细胞培养	Caplan，1991
1997	滤膜孔插入法和侵袭研究；用共聚焦显微术研究细胞能动性	Brunton et al.，1997
1998	组织工程软骨	Aigner et al.，1998
	人胚胎干细胞培养	Thomson et al.，1998
1999	在一次性摇袋式生物反应器中大规模培养悬浮细胞	Singh，1999
2000	内皮素回复黑素细胞至前体细胞并分化成为胶质细胞	Dupin et al.，2000
	少突胶质细胞祖细胞回复至普通神经干细胞	Kondo and Raff，2000
2002	组织工程探索	Atala and Lanza，2002；Vunjak-Novakovic Freshney，2006
2003	施万细胞体外转化为胶质-黑素前体细胞	Dupin et al.，2003
2007	成体细胞重编程为多能干（iPS）细胞	Yu et al.，2007
	细胞色素氧化酶条形编码用于物种鉴定	Cooper et al.，2007
2008	用丙戊酸重编程诱导成 iPS 细胞	Huangfu et al.，2008
	以培养的上皮细胞和干细胞重聚于去细胞的气管产生组织工程气道	Macchiarini et al.，2008
2010	错误鉴定细胞系的数据库	Capes-Davis et al.，2010
	细胞系的 STR 表达谱及鉴定	Barallon et al.，2010
2012	国际细胞系鉴定委员会（ICLAC）的设立	Master et al.，2012

注：另见 Pollack（1981）

之后，当经 X 射线照射的饲养层（feeder layer）的概念被引入克隆技术后，Puck 和 Marcus（1955）克隆了 HeLa 细胞。抗生素的引入有利于细胞系的长期繁殖，虽然不少学者已提出警告，指出抗生素的连续应用会造成隐性的或抗生素抵抗的污染风险（Parker，1961，2006）。20 世纪 50 年代是合成培养基发展的年代（Morgan et al.，1950；Parker et al.，1954；Eagle，1955，1959；Waymouth，1959），并最终导致无血清培养基（serum-free medium）的问世（Ham，1963，1965）（见 9.5 节）。

本书自始至终将“组织培养”（tissue culture）一词作为一个通称，它既包括器官培养（organ culture），也包括细胞培养（cell culture）。器官培养均是指未离散组织的三维培养（three-dimensional culture），它保持着体内（*in vivo*）组织部分或全部组织学特征。细胞培养则指离散细胞的培养，这些细胞是经酶、机械或化学的方法离散后，从来源组织、原代培养物（primary culture）、

细胞系（cell line）或细胞株（cell strain）获得的。至于组织型培养（histotypic culture）意为细胞重新聚集，或生长成为一个具有组织样细胞密度的三维结构。例如，在滤膜孔中的高密度培养、在培养瓶中或培养皿上单层（monolayer）的灌注及过度生长、悬浮于琼脂上的细胞在真实或模拟的零重力（zero gravity）下的重聚集（reaggregation），或者细胞在诸如胶原蛋白凝胶这种三维基质中的侵润性生长等。器官型培养（organotypic culture）是运用相同的操作程序，但是将不同的细胞谱系（lineage）重组，如将表皮角质形成细胞（epidermal keratinocyte）与表皮成纤维细胞重组在一起，意图形成一种组织类似物（tissue equivalent）。

1907 年，Harrison 选用蛙作为组织来源，可能是因为它属于冷血动物，这样便无须温育。此外，在较低等的脊椎动物中组织再生也较常见，或许他认为与哺乳动物的组织比较起来，蛙的组织更易生长。虽然 Harrison 的技术掀起了人们对体外组织培养兴趣的新高潮，但后来极少有人跟随他用这种种属作为材料。医学科学的刺激将人们的兴趣转向了对温血动物的研究，它们的正常发育和病理改变均与人体内的过程颇为相似。由于能较容易地获得各种不同的组织，其中不少在培养中生长良好，鸡胚成为人们所喜欢选用的材料，但是随着实验性畜牧业，尤其是遗传性纯种啮齿动物饲养的发展，哺乳动物成为更受青睐的材料。虽然鸡胚组织的原代培养可以提供各种类型的细胞，但啮齿动物组织具有形成连续细胞系（continuous cell line）的优点（Earle et al.，1943），而且可以产生各种各样的移植性肿瘤。转基因小鼠技术的建立（Beddington，1992；Peat et al.，1992）及对小鼠遗传学背景的洞悉更让人乐于选择它作为实验动物。

后来，研究证明人类肿瘤也能够产生连续细胞系，诸如 HeLa 细胞（Gey et al.，1952），加之 Leonard Hayflick 有关培养中细胞生命期是有限的经典研究（Hayflick and Moorhead，1961），以及病毒学家和分子遗传学家偏爱用人体材料进行研究，更加激起了人们对人体组织的兴趣。之后，为培养特殊的细胞类型，诸如表皮角质形成细胞、支气管上皮细胞、血管内皮细胞，人们又开发出多种不同的无血清培养基（见 9.2 节），进一步激起了人们对人体组织培养的兴趣。但现在无血清培养基已有市售，虽然与常用培养基比较起来，这些无血清培养基在价格上要昂贵一些。

虽然低等脊椎动物和无脊椎动物在发育过程中的许多特性（如两栖类的组织再生、昆虫的变态等）使它们成为研究发育分子基础的良好系统，但多年来，它们的细胞培养未能如鸟类和哺乳类那样受到同样的关注。新近出于农业和虫害防控的需要，又激发了人们对昆虫毒性和病毒性的研究。基因技术的发展表明具有杆状病毒和其他载体的昆虫细胞系是十分有用的发生器细胞系（producer cell line），因为在病毒 DNA 中可以插入较大的基因组序列，并可降低传播人类致病性病毒的风险。此外，渔业的经济重要性，以及淡水和海洋污染的问题也敦促人们更多地进行有关鱼类正常发育和病理发生的研究。虽然迄今市售的用于鱼类和昆虫细胞的特殊培养基种类有限，但对非哺乳类动物细胞培养的操作程序仍可参照已建立起来的哺乳动物细胞培养的程序进行（见 25.8 节）。

我们将适合运用细胞培养这种技术手段进行实验研究的类型小结于图 1.2，其中包括基本的细胞代谢研究、不同发育阶段的基因表达调控和细胞的表型，这些研究涉及免疫学、药理学、毒理学及组织再生和移植。

起初，细胞培养的发展很大程度上出于医学研究两大方面的需要，即抗病毒疫苗的产生和对肿瘤发生的认识。用于生产的条件、细胞系及病毒实验的标准化无疑大大推动了现代组织培养技术的发展，尤其是促使产生了很多适用于生物化学和分子分析的细胞。可靠的培养基和血清的商

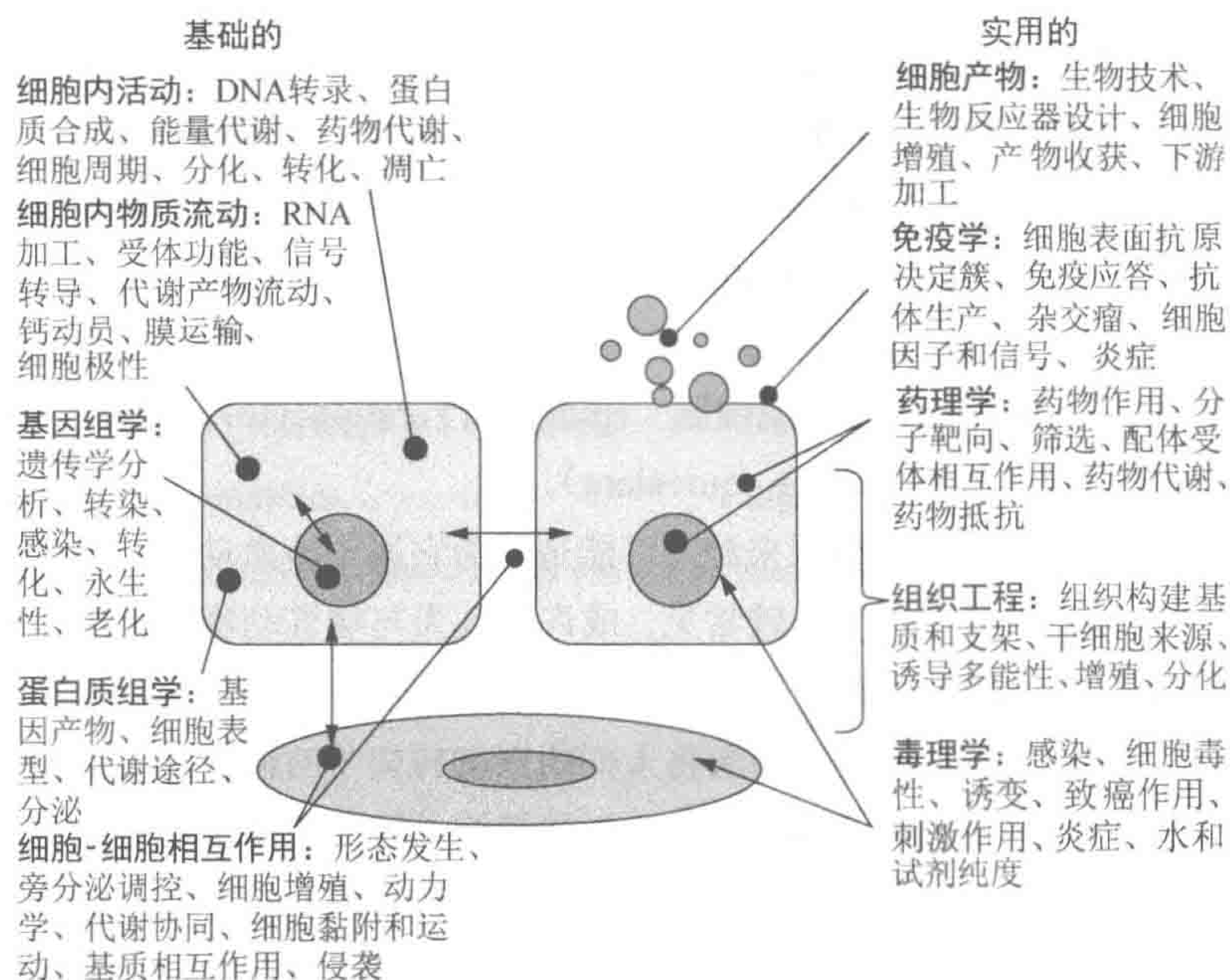


图 1.2　组织培养的应用

业供应，以及抗生素和洁净气流设备对污染的强有力的控制也促使了诸多技术的改良，这也使得组织培养能适用于广泛的领域。如今，组织培养不只是少数研究的神秘工具，它业已成为许多学科和广大的生物制药企业的生产工具。

来自公众的观点也为组织培养增添了其重要性的分量，反映在许多动物权利组织（animal-right group）所表达出来的对一些不必要的实验动物使用的关注。虽然大多数人认为，新药的临床前试验可以继续使用一些动物，但人们更为关注为了化妆品的开发及类似的工作而广泛使用动物是否合乎道义。因此，更多地利用体外实验进行相关研究的呼声与日俱增。然而，采纳体外实验也仍需要适当的法律程序的确认及人们的普遍接受。虽然数年前这似乎只是一个遥远的期盼，但不少更敏感、更特异的靶向体外实验的引入，以及能非常真实地反映出炎症的体外实验均促进了体外实验的空前发展（见 24.6 节）。

细胞融合技术（Pontecorvo，1975）、核酸杂交（Gillespie and Spiegelman，1965）及基因操纵（Maniatis et al.，1978；Shih et al.，1979）的引入使得基因组分析及其转录调控取得了很大的进展。基因操纵和转录分析也使得细胞系成为研究工具及生物制药的生产平台。随着 DNA 测序程序进展，基因技术迅速扩展，现已成为包括基因转移、插入、缺失、表达、沉默等技术的工具。技术学改进使得我们对基因表达调控和蛋白质合成如何影响细胞正常及异常表型有了更好的了解。人类基因组计划（Human Genome Project）已完成了全部的人基因组测序（Baltimore，2001），因此又为用多基因阵列技术分析基因表达新增了有利因素（Iyer et al.，1999）。

正如细胞融合技术那样，单克隆抗体技术（monoclonal antibody technique）的问世（Kohler and Milstein，1975）揭开了基因操纵新研究领域的序幕，使得人们可以窥察抗体的作用机制和表位结构及其相互作用的信息。由于人们已经能够将探索的基因插入原核和真核细胞内，因此已涌现出大量的新技术，数十亿美元的企业也应运而生。细胞产物，诸如人生长激素、胰岛素、干扰素

及多种抗体现今均可用常规的遗传修饰细胞来生产。细菌中转录后修饰的缺陷，如糖基化等，提示真核细胞尤其是哺乳类动物细胞可以作为更合适的载体（Grampp et al.，1992），尤其从发展永生性技术（immortalization technology）考虑更是如此（见 22.3.2 节和短篇综述 22.1）。

在细胞分化和发育中，细胞相互作用、细胞内和细胞间信号传导，以及细胞分化和发育中转录因子的作用研究（Jessell and Melton，1992；Ohmichi et al.，1998；Balkovetz and Lipschutz，1999）不仅提供了有价值的组织移植机制的基本信息，并且开辟了再生医学（regenerative medicine）全新的领域（见 2.2 节、2.4 节、2.5 节、19.7.1 节）。最初观察到表皮细胞培养可形成有功能分化的皮层（Green et al.，1979）及内皮细胞可形成毛细血管（Folkman and Haudenschild，1980），这为同种移植和利用个体自己的细胞进行整形外科（Limat et al.，1996；Tuszynski et al.，1996；Gustafson et al.，1998），特别是为严重烧伤治疗（Gobet et al.，1997；Wright et al.，1998；Vunjak-Novakovic，2006）提供了可能性（见 20.4.2 节）。由于能将正常基因转染至有遗传缺陷的细胞，因此有可能将“纠正了的”细胞植回至患者体内。已报道，β-地中海贫血的基因治疗已成为临床现实（Drakopoulou et al.，2013），当将正常的胰岛素基因转移至来自糖尿病患者的培养 β-胰岛细胞，甚至其他类型的细胞，诸如骨骼肌前体细胞（Morgan et al.，1992）或肝细胞（Banga et al.，2014）时，这些细胞也可参与至更新率低的组织中去，并且还有可能发挥持久的生理功效。

然而，神经病学研究的进展迄今未能因使用来自正常脑或神经组织的可增殖的细胞系而见成效，因为直到现在，在体外神经细胞并不能增殖，除非选用转化的细胞（transformed cell）（见 22.3 节）。然而，人胚胎干细胞培养（Thomson et al.，1998；Webber and Minger，2004）和其他人多能干细胞（Lei and Schaffer，2013）的建立表明用这一途径所增殖的培养物可以分化成为神经元，可以为神经系统疾病提供有用的特殊模型（Ebert et al.，2008）。

培养细胞移植开辟了一个全新的细胞培养分支领域，即组织工程（Atala and Lanza，2002；Vunjak-Novakovic and Freshney，2006），它包括人胚胎干细胞（embryonal stem cell，ESC）和成体干细胞（adult stem cell），如间充质干细胞（MSC）或诱导多能干细胞（iPSC）的分离和分化、基因转移、通过器官型培养生成组织对应物（见 20.4 节）、材料科学、生物反应器的修建和利用，以及移植技术。现已证明将正常胎儿神经元植入帕金森病患者在技术上是可行的（Brundin et al.，2010；Politis and Lindvall，2012），但仍存在科学与伦理问题，即为此目的是否必须用胎儿组织或者应将重点放在 iPSC 上。

从早期胚胎实验发展而来的体外受精技术（*in vitro* fertilization，IVF）（Edwards，1996）现已得到广泛应用（如见 Gardner and Lane，2003），而且在法律上与伦理上也已为许多国家所接受。将剩余的胚胎用于科学研究也已为某些国家所接受，这对于发育过程的认识，以及如何操纵所产生的细胞系将进一步提供十分有价值的材料。然而，由此在发育生物学中产生了激烈的伦理辩论，即由睾丸和卵巢或 ES 细胞中分离到的原始生殖细胞的培养并形成配子的问题（Dennis，2003；Gosden，2013）。人们已从小鼠胚胎卵巢中分离培养了卵母细胞，并且进行移植，产生了正常的小鼠（Eppig，1996；Obata et al.，2002）。另外也从新生公牛睾丸中获得了精子，并且可与睾丸支持细胞（sertoli cell）共培育（Lee et al.，2001）。相似的工作还有从小鼠睾丸中获得精子细胞（spermatid），让它们与小鼠卵受精，获得了成熟的、有繁殖能力的成体（Marh et al.，2003）。

组织培养也被用于诊断和毒理学。羊膜穿刺术（amniocentesis，见 26.3.1 节）可以诊断早期

胚胎的遗传性疾病，尽管聚合酶链反应（PCR）和直接取样正逐步地取代这一方法。此外，药物成分和潜在的环境污染物的毒性作用也可用体外方法检测（见24.3.1节、24.3.2节、24.3.5节）。近年来，由于对实验动物使用方法的思考有所改变，体外毒性实验受到高度重视，尤其在欧洲。

1.2 组织培养的优点

1.2.1 环境控制

组织培养的两个主要优点（表1.2）在于：能够调控那些需要精确控制的理化环境（pH、温度、渗透压、O_2和CO_2的气压）；必须保持相对恒定的生理环境。但是，生理环境不总是十分明确的，因为细胞系培养需要培养基的补充，而培养基中含有血清和其他某些难以明确其组成的物质。这些补充物因批次不同而有差异，并含有诸如激素、其他刺激物和抑制剂之类不十分确定的因子。随着对血清中某些主要成分的确定（见表8.6），以及对细胞增殖调控因子的深入认识（见表9.4），人们能够用明确的成分替代血清（见9.4节）。细胞外基质（extracellular matrix，ECM）也如血清那样对细胞培养是重要的，常常也是必需的，但也不总是十分确定的。随着克隆化基质成分（cloned matrix constituent）的出现，确定ECM的前景有新改观（Kortesmaa et al.，2000；Belin and Rousselle，2006；Braam et al.，2008；Dame and Verani，2008；Domogatskaya et al.，2008）（另见补充材料*附录III）。

表1.2 组织培养的优点

范畴	优点
生理化学环境	控制pH、温度、渗透压、可溶性气体
生理条件	控制激素、生长因子和营养物质的浓度
微环境	调节基质、细胞-细胞间相互作用、气体弥散
细胞系均一性	可应用选择性培养基，细胞克隆化
鉴定	细胞学、DNA谱和易进行免疫染色
保存	培养物可在液氮冷冻器中储存
真实性和可信性	可鉴定并记录其来源、身份、历史及纯度
复制和变异性	易进行定量分析和最小统计分析；易行多次复制
节省试剂	容积减少，直接作用于细胞，成本低
C×T控制	能限定剂量、浓度和时间（暴露长短）
自动化和机械化	可微量滴定、自动化和恒化器
规模	培养容积可从几微升到10~20 000L
节省时间	至少按重要性安排，可缩短检测时间
减少动物使用	药物、化妆品等的细胞毒性测试和筛选

* 本书补充方案请扫描二维码从“多媒体”栏目获取。

1.2.2 样品的特征和均一性

组织样品的异质性（heterogeneous）不可避免。即使来源于同一组织，不同组成细胞类型的复制也不一样。经过一次或二次传代后，培养的细胞系会呈现出均一性（或者至少均匀性）的构成。这是因为每次传代细胞随机性地混合、培养条件的选择性压力有利于最有活力的细胞类型的生长，进而产生均一性的培养物。所以，每次传代时，复制样品是相互一致的，细胞系的特征在经过数次传代后可以固定下来，如果将细胞系储存于液氮内，这些特征可永久保持。由于实验的复制样品基本上是相同的，因此不太需要进行异变性的统计学分析。当需要对细胞系的同一性（见13.1.4节和短篇综述13.1）和污染（见14.3节）进行严格测试时，则为了确保储存细胞系可用于进一步的研究和商业应用。

1.2.3 经济、规模和机械化

由于培养物可以受到低浓度、成分明确的试剂的直接暴露，试剂可直接接触细胞，比起体内注射所用试剂要少得多，因为体内注射时，90%以上的试剂由于排泄和分布于非研究的其他多种组织而丢失。这对于多种变数和重复的筛选实验要经济得多，而且可以避免动物实验所遇到的法律、道德和伦理问题。多孔培养板和自动化技术的运用也使得组织培养在时间上、规模上都更加经济有效，微流控（microfluidics）可对反应进行实时分析（Su et al.，2011）（见短篇综述21.2）。

1.2.4 体内环境的体外模拟

灌注培养技术使得特殊实验成分的释放在浓度、作用时间（表1.2）和代谢状态等方面均可受到调控。组织型和器官型模型的发展更能准确复制体内细胞表型，并且增加了体内模型相关的靶向代谢途径的准确性。

1.3 局 限 性

1.3.1 专业技能

培养操作必须在严格的无菌条件下进行，因为动物细胞的生长比许多常见的污染物，如细菌、真菌、酵母的生长，都要慢很多（表1.3）。此外，与微生物不一样，正常状态下多细胞动物的细胞不能孤立存在，因此没有一个复合的环境刺激血浆或组织液的作用，它们将不能维持独立的存活状态。这些条件便要求操作者具有一定的技术和知识水平以便理解培养系统的要求，并在出现问题时知道症结所在（见第5章、第28章）。同时，我们也需要谨慎地避免反复发生交叉污染（cross-contamination），并对所保存的细胞进行论证（见13.1节）。因此，不应将组织培养看作只是不经意地进行一两次实验而已，而是需要适当培训（见第27章），操作程序及操作环境都要严格控制。

表 1.3 组织培养的局限性

范畴	举例
必需的专业技能	无菌操作，避免化学污染，微生物污染的检测，警惕并检测鉴定的错误
环境控制	工作场所的隔离和清洁，基质和容器的清洁，试剂纯度，温育，pH控制
安全问题	分类实验室的污染物，要求有生物安全柜 生物有害物质的控制与处置
量与成本	规模培养需要重型设备 培养基和血清 一次性塑料制品
遗传不稳定性	异质性，变异性
表型不稳定性	去分化 适应性 选择性过度生长
细胞类型的鉴定	不总是表达的标志 难以重建的组织学及其不典型性 几何学和微环境改变细胞学
药代动力学	难以模拟消化、吸收、分布、代谢和分泌

1.3.2 量的问题

细胞培养的一个主要局限性在于所付出的努力和物质只能生产出相当少的一些组织。对于绝大多数实验室（只有两个或3个人从事组织培养），每批的实际最大产量可能只有1~10g（湿重）细胞。一个较大一点的实验室稍做努力并在设备上多投入，每批的产量则有可能达10~100g。100g以上的产量则意味着企业化的小规模生产水平，这是大多数实验室做不到的，但只要有特殊的设备，也有可能达到千克级的产量。

除去资金和劳动力的投入，以培养来生产细胞的投入要比用动物组织高出10倍，2013年，伦敦消费了世界第一个组织培养生长的汉堡*。据创始人Masstricht大学的Mark Post教授计算，该汉堡共花费掉330 000英镑。因此，当需要生产10g以上的组织而仍然采用培养方法时，则必须提出足以令人信服的理由。对于10g左右较小量的生产，其费用较容易由常规开支承担，但需要考虑的是实验或准备过程是否能够按比例予以缩减。由于操作时间短、容积小、离心时间短，微量或毫微量实验检测常能迅速完成，因此这些实验更容易自动化（见23.8节、24.3.5节）。比例缩减和自动化实验使得可以进行更多的测试，相应地则是要求细胞的制备也需自动化（见21.5节）。

1.3.3 去分化和选择

自20世纪50年代细胞系增殖第一次取得重大进展时起，许多科研工作者观察到细胞系丧失了其来源组织的特有的细胞表型特征。人们将这一作用归咎于“去分化”，即一种被认为是分化

* 译者注：2013年8月5日英国Maastricht大学生理系教授Mark Post用干细胞培养生产出牛肉，并用此制作成汉堡。

回复的过程，但后来人们又证明这一现象的发生主要是由于同一种或不同细胞谱系中未分化细胞过度生长。无血清选择培养基的发展（见 9.2 节、16.6 节）使得人们有可能分离特殊的细胞谱系，虽然在正常的连续增殖的条件下，它们的分化特征常会丢失。分化的细胞，当它们开始增殖时或者发生去分化，或者，更可能是那些具有更强增殖能力的未分化的前体细胞在培养中占据了优势生长。然而在适当的诱导条件下，这些细胞的许多分化特征可以再次呈现出来（见 19.7 节），尽管它们可能会停止增殖（见图 2.7）。

1.3.4 细胞的起源

不论出于什么原因，如果细胞失去了分化的特征，就很难将培养的细胞与其来源组织中有功能的细胞联系起来。此时稳定的标记是鉴定细胞所必需的（见 18.3 节）。此外，培养条件可能也需要进行相应的调整以利于这些标记的表达（见 2.4 节、19.7 节）。然而，特征丢失的问题不仅仅是生理性的，令人遗憾的是，由于与其他细胞系产生交叉污染或是在培养或冻存储存时标记出错，许多细胞系的鉴定有错误（见 13.1.1 节）。因此必须要有特殊技术或检测方法以保证所用的每一个细胞系的权威认证（见 13.1.4 节和短篇综述 13.1）。

1.3.5 不稳定性

不稳定性（instability）是许多连续细胞系所面临的一个重要问题，这是由它们非整倍体染色体组成不稳定所导致。即便是未转化的细胞经过短期培养，细胞群体生长速度和分化能力上的异质性也能使得细胞代与代之间产生差异（见 22.2 节）。

1.4 体外的主要差异

培养的细胞和它们体内相对应的细胞在细胞行为上的许多差异源于体外培养的细胞丧失了三维几何（three-dimensional geometry）的空间环境，以及它们在二维基质（two-dimensional substrate）上增殖的能力。此时，组织中组织学所特有的特殊细胞间相互作用的特征不复存在。随着细胞铺展开来，它们具有了运动性，并且在许多情况下，它们开始增殖，细胞群体生长分数增加。当一个细胞系形成时，它可能只代表一种或两种细胞类型，许多异质性的细胞与细胞之间的相互作用也不复存在。

体外的培养环境还缺乏数种在体内参与稳态调控的系统调控成分，主要是神经系统和内分泌系统。没有了这些调控作用，体外的细胞代谢可能比体内的更稳定，但这可能并非真实地反映了细胞来源组织的代谢状况。对这一事实的认识，使人们在培养液中添加了许多不同的激素（见 9.4.4 节、9.4.5 节），并且这种做法看似会持续下去。由于缺乏氧运输者（血红蛋白），氧张力低，因此体外的能量代谢主要靠糖酵解，虽然柠檬酸循环也存在，但所起作用较小。

不难发现体外培养中细胞所处的环境与其在体内的环境有颇多的差异（见 24.2 节），导致人们对组织培养存有疑虑。然而，纵使不能否认这些差异的存在，在组织培养中仍可表达许多特殊

的途径和特化的功能，当前已有不少促使正确表型表达的技术可以利用（见第19章、第20章）。

1.5 组织培养的类型

维持组织培养的方法主要有3种（Schaeffer，1990）（附录Ⅱ，图1.3，表1.4）：①器官培养，指在培养中仍然维持着，或至少部分维持着体内（*in vivo*）组织的结构特征（见20.2节）。为达到此目的，组织需要培养在液-气界面上（在一个筏、网格或胶上），这样有利于保持组织的球形或三维形态。②原代外植块培养（primary explants culture），即将组织小块置于玻璃（或塑料）固-液界面，贴壁之后，可促进细胞在固体基质平面上迁徙（见11.3.1节）。③细胞培养，指将组织或原代外植块的外生（outgrowth）细胞分散开来（用机械的或酶学的方法），使呈细胞悬液，然后将其培养于固体基质上形成贴伏的单层，或使其在培养基中呈悬浮状态生长（见11.3节、12.4.5节）。

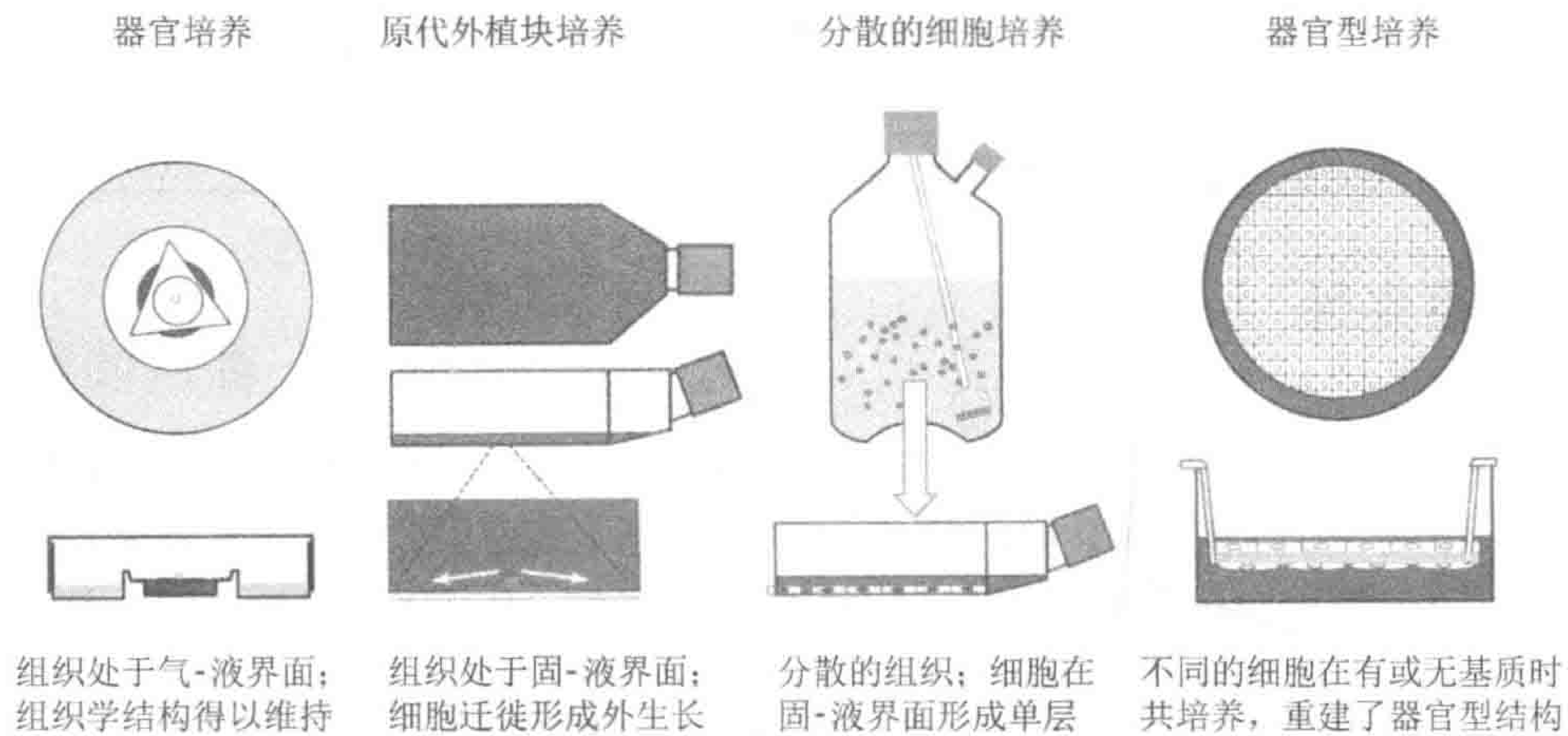


图1.3 组织培养的类型

表1.4 不同培养类型的特征

类目	器官培养	原代外植块培养	细胞培养	器官型培养
来源	胚胎器官、成体组织小块	组织小块	分散的组织、原代培养、增殖的细胞系	原代培养或细胞系
所需努力	大	中等	少	中等
特征鉴定	容易，组织学	细胞学和标记	生化、分子、免疫学和细胞学检测	组织学、共焦显微镜或MRI
组织学	可提供信息	困难	不适用	可提供信息
生化差异	有可能	异质性和动态的	丢失，但可重诱导	常常再表达
增殖	不可能	可能外生长	标准程序	仅在分散后
标本复制、再繁殖、同质性	标本间差异性高	标本间差异性高	标本间差异性低	标本间差异性低
定量分析	困难	困难	容易，有许多技术可以利用	可能需要成像分析

由于保留了培养物来源组织细胞之间的相互作用，器官培养保持了该组织的分化特征。它们不会迅速生长（细胞增殖局限于外植块的边缘，并且主要限于胚胎组织），因此也就不会增殖，

每次实验都需要新鲜种植，这表明与细胞培养相比，器官培养所需要的努力较多，但标本很少能再生利用。因此，对器官培养进行量化是较困难的，用于培养的组织块的量受到外植块大小（约 $1mm^3$）的限制，此外还受到分离组织和建立培养所需的工作量多少的限制。

细胞培养可以从原代外植块或分散的细胞悬液中建立起来。由于在这种条件下细胞可以增殖，因此可以用于细胞系的繁殖。单层细胞或生长分散程度比较高的细胞悬液（见 23.11.1 节）可以通过酶学处理分散开来，或简单稀释后重新种植或传代至新的培养皿（表 1.5，另见 12.2 节、12.5 节）。这样便构成了再次培养（subculture）或传代（passage），所形成的子细胞培养物成为细胞系的起点。

表 1.5 传代

优点	缺点
增殖	酶或机械分散引起损伤
更多的细胞	非特化的或基质细胞的过度生长
克隆的可能性	选择出更适合培养的细胞
增加均一性	分化特征的丢失（可能是可诱导的）
特性、鉴定	遗传不稳定性
扩大原初培养物、冻存、分选	增加了错误鉴定或交叉污染的危险性

通过原代培养形成细胞系具有以下意义：①经数代后细胞总数增加（群体倍增）；②具有高增殖能力的细胞或细胞谱系最终占主要地位；③细胞群体在一定程度上的均一性（表 1.5），该细胞系具有一定的特征，并且这些特征在细胞系的大部分有限的生存期中得以保持。连续的（或曾为人们所熟知的“已建立的”）细胞系的衍生细胞存在细胞表型的改变，称为转化（transformation）（见 2.7.4 节、22.2.1 节）。这种细胞的形成往往伴有细胞增殖率的增加，并且具有较高的贴壁效应（见 22.4 节）。

当用克隆（cloning）或某些其他方法从培养物中将细胞选出时，该亚系（subline）即称为细胞株。此时意味着它具有更明确的特征。细胞系或细胞株可以通过贴壁的细胞单层或悬浮生长而增殖。单层培养（monolayer culture）即指细胞贴附基质而生长。停泊依赖性（anchorage dependence）意为细胞对基质的贴附（通常有一定程度的铺展），是细胞增殖的先决条件。单层培养是大多数正常细胞的共同生长方式，但造血细胞除外。悬浮培养（suspension culture）是从顺应那些不需要贴附（停泊非依赖性）便能生存和增殖的细胞所衍生而来的。这种能力只限于造血细胞、转化细胞和源自恶性肿瘤的细胞。然而，也有证据表明，在许多正常组织中也存在着一小部分细胞，它们也可以在悬浮状态下增殖（见 22.4.1 节）。对这些细胞的认识迄今仍不太清楚，但有人推测它们可能与干细胞或未定向前体细胞有关。这一观点提示比起充分分化的细胞来，培养的细胞系更能代表体内前体细胞簇群（precursor cell compartment），因为大多数分化的细胞通常不能分裂（见 2.4 节、19.3 节）。

由于培养的细胞可以繁殖形成均匀的细胞悬液或单层，因此在定量分析、特征鉴定和标本复制等方面有许多优点，但是都缺乏器官培养所具有的细胞间的相互作用及细胞与机制相互作用。正因为如此，许多科研工作者企图重建三维（3D）的细胞结构（见 20.3 节、20.4 节和短篇综述 20.1）。发展这些技术需要引入或至少定义某些术语。组织型培养（histotypic culture 或 histoculture）

（我个人用 histotypic culture）是指一种细胞类型的高密度或“组织样”（tissue-like）的培养；而器官型培养（organotypic culture）意味着存在一种以上的细胞类型，而且可以像在来源器官中那样相互作用。器官型培养为研究分散的、限定的均质性群体，潜在遗传和表型限定的细胞相互作用，以及为创造适用于移植的分化细胞群体的可能性提供了新的技术。由于3D结构需要正确的表型表达，因此人们意图设计3D培养多重复制的高通量筛选技术（Hsiao et al.，2011）。

从许多方面来说，细胞培养研究中最令人欣喜的发展在于人们认识到无论在均质的或异质的培养细胞群体中，必然有特殊的细胞相互作用。这一认识标志着从基本的分子生物学纪元（在亚细胞水平上揭示出许多调控过程）过渡到细胞或组织生物学纪元（将对细胞相互作用的理解应用至整合的细胞群体、细胞间更精确的细胞信号转导及在体外制造有充分功能的组织）。最终所需的参数可从化学方面鉴别出来，从而提供寻找纯的单种细胞类型反应物的基础，但是对3D培养的要求仍在于需要反应细胞具有正常的形态和极性。

参考文献

Abercrombie M, Heaysman JE (1953). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp. Cell Res.* **5**:111–131.

Abercrombie M, Heaysman JEM (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture; II: "Monolayering" of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **6**:293–306.

Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C Kastenbauer E, Naumann A (1998). Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J. Biomed. Mater. Res.* **42** (2):172–181.

Atala A, Lanza RP (2002). *Methods of tissue engineering*. San Diego: Academic Press.

Balkovetz DF, Lipschutz JH (1999). Hepatocyte growth factor and the kidney: It is not just for the liver. *Int. Rev. Cytol.* **186**:225–260.

Balls M, Coecke S, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman LM, Stacey G, Stokes W (2006). The importance of good cell culture practice (GCCP). *ALTEX* **23**(suppl):270–273.

Baltimore D (2001). Our genome unveiled. *Nature* **409**:814–816.

Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JM (2014), Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Ther.* **10**:19-27.

Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L (2010). Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **46**:727–732.

Beddington R (1992). Transgenic mutagenesis in the mouse. *Trends Genet.* **8**:10.

Belin V, Rousselle P (2006). Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. *Protein Exp. Purif.* **48**:43–48.

Bell E, Sher S, Hull B., Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y (1983). The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* **81**(1 suppl):2s–10s.

Berry MN, Friend DS (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**:506–520.

Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, Lebrin F, Kats P, Hochstenbach R, Passier R, Sonnenberg A, Mummery CL (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells* **26**:2257–2265.

Bradley TR, Metcalf D (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **44**(3):287–299.

Briggs R, King TJ (1960). Serial transplantation of embryonic nuclei. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **21**:271–290.

Brundin P, Barker RA, Parmar M (2010). Neural grafting in Parkinson's disease problems and possibilities. *Progress Brain Res.* **184**:265–294.

Brunton V, Ozanne B, Paraskeva C, Frame M (1997). A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer. *Oncogene* **14**:283–293.

Buonassisi V, Sato G, Cohen AI (1962). Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:1184–1190.

Burrows MT (1912). Rhytmische Kontraktionen der isolierten Herzmuskelzelle Ausserhalb des Organismus. *Münch. Med. Wochenschr.* **LIX**:1473.

Butler M (1991). *Mammalian cell biotechnology*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press.

Canti RG (1928). Cinematograph demonstration of living tissue cells growing in vitro. *Arch. Exp. Zellforsch.* **6**:86–97.

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, Macleod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer* **127**:1–8.

Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**:641–650.

Carrel A (1912). On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* **15**:516–528.

Carrel A, Ebeling AH (1923). Survival and growth of fibroblasts in vitro. *J. Exp. Med.* **XXXVIII**:487.

Chambard M, Verner B, Gabrion J, Mauchamp J, Bugeia JC, Pelassy C, Mercier B (1983). Polarization of thyroid cells in culture: Evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and

of the thyroid-stimulating hormone receptor to adenyl cyclase complex. *J. Cell Biol.* **96**:1172–1177.

Chen TR (1977). In situ detection of mycoplasm contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.* **104**:255.

Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**(3):1311–1326.

Collen D, Stassen JM, Marafino BJ Jr, Builder S, De Cock F, Ogez J, Tajiri D, Pennica D, Bennett WF, Salwa J, et al. (1984). Biological properties of human tissue-type plasminogen activator obtained by expression of recombinant DNA in mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**(1):146–152.

Collins CH, Kennedy DA (1999). Evolution of microbiological safety cabinets. *Br. J. Biomed. Sci.* **56**:161–169.

Cooper JK, Syke G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanne R, Ikonomi P (2007). Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **43**:344–351.

Coriell LL, Tall MG, Gaskill H (1958). Common antigens in tissue culture cell lines. *Science* **128**:198.

Cruikshank CND, Lowbury EJL (1952). Effect of antibiotics on tissue cultures of human skin. *Br. Med. J.* **2**:1070.

Cunha GR (1973). The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. Anat. Rec. 175:87–96.

Cunha GR, Chung LWK (1981). Stromal-epithelial interactions. I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J. Steroid Biochem.* **14**:1317–1321.

Dame MK, Varani J (2008). Recombinant collagen for animal product-free dextran microcarriers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **44**:407–414.

Dao C, Metcalf D, Zittoun R, Bilski-Pasquier G (1977). Normal human bone marrow cultures in vitro: cellular composition and maturation of the granulocytic colonies. *Br. J. Haematol.* **37**:127–136.

Darnell JE, Jelinek WR, Molloy GR. (1973). Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells. *Science* **181**:1215–1221.

Darnell JE (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* **297**:365–371.

Dennis, C. (2003). Developmental biology: Synthetic sex cells. Nature, 424:364–6.

De Vitry F, Camier M, Czernichow P, Benda P, Cohen P, Tixier-Vidal A (1974). Establishment of a clone of mouse hypothalamic neurosecretory cells synthesizing neurophysin and vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:3575–3579.

Domogatskaya A, Rodin S, Boutaud A, Tryggvason K (2008). Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro. *Stem Cells* **26**:2800–2809.

Drakopoulou E, Papanikolaou E, Georgomanoli M, Anagnou NP (2013). Towards more successful gene therapy clinical trials for β-thalassemia. *Curr. Mol. Med.* **13**:1314–1330.

Dulbecco R (1952). Production of plaques in monolayers of tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**:747.

Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, le Douarin NM (2000). Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7882–7887.

Dupin E, Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, le Douarin NM (2003). Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages, transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5229–5233.

Eagle H (1955). The specific amino acid requirements of mammalian cells (stain L) in tissue culture. *J. Biol. Chem.* **214**:839.

Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**:432.

Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E (1943). Production of malignancy *in vitro*; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**:165–212.

Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**:277–280.

Edwards RG (1996). The history of assisted human conception with especial reference to endocrinology. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **104**(3):183-204.

Enders JF, Weller TJ, Robbins FC (1949). Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis in cultures of various human embryonic tissues. *Science* **109**:85.

Eppig JJ, O'Brien MJ (1996), Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* **54**:197–207.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**:389–396.

Farrell LN, Wood W, Franklin AE, Shimada FT, Macmorine HG, Rhodes AJ (1953). Cultivation of poliomyelitis virus in tissue culture.VI. Methods for quantity production of poliomyelitis viruses in cultures of monkey kidney. *Can. J. Public Health* **44**:273–280.

Fell HB, Robison R (1929). The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated *in vitro. Biochem. J.* **23**:767–784.

Fischer A. (1925). *Tissue culture. Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro*. London: Heinemann.

Folkman J, Haudenschild C (1980). Angiogenesis *in vitro. Nature* **288**:551–556.

Folkman J, Moscona A (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**:345–349.

Fusenig NE (1971). Isolation and cultivation of epidermal cells from embryonic mouse skin. *Naturwissenschaften* **58**:421.

Gardner DK, Lane M (2003). Towards a single embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* **6**(4):470–481.

Gartler SM (1967). Genetic markers as tracers in cell culture. 2nd Decennial Review Conference on Cell, Tissue and Organ Culture. *NCI Monograph* **26**, pp. 167–195.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward 4, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JR, Meredith J, Stacey GN1, Thraves P, Vias M; Cancer Research UK (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **111**:1021–1046.

Gerper P, Whang-Peng J, Monroe JH (1969). Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**(3):740–747.

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**:364–365.

Gillespie D, Spiegelman S (1965). A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**:829–842.

Gobet R, Raghunath M, Altermatt S, Meuli-Simmen C, Benathan M, Dietl A, Meuli M (1997). Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery. *Surgery* **121**:546–661.

Gosden RG (2013). Programmes and prospects for ovotechnology. *Reprod. Biomed. Online* **27**(6):702–709.

Gospodarowicz D (1974). Localization of fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**:123–127.

Gospodarowicz D, Moran J (1974). Growth factors in mammalian cell cultures. *Annu. Rev. Biochem.* **45**:531–558.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR (1978). Determination of cell shape by the extracellular matrix and its

correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* **38**:4155–4171.

Graham FL, Van der Eb AJ (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456–461.

Grampp GE, Sambanis A, Stephanopoulos GN (1992). Use of regulated secretion in protein production from animal cells: An overview. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **46**:35–62.

Green H (1977). Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* **11**:405–416.

Green H, Kehinde O, Thomas J (1979). Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5665–5668.

Grobstein C (1956). Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp. Cell Res.* **10**:424–440.

Gurdon JB (1960). Factors responsible for the abnormal development of embryos obtained by nuclear transplantation in Xenopus laevis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **8**:327–340.

Gustafson CJ, Eldh J, Kratz G (1998). Culture of human urothelial cells on a cell-free dermis for autotransplantation. *Eur. Urol.* **33**:503–506.

Ham RG (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell Res.* **29**:515.

Ham RG (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**:288.

Ham RG, McKeehan, WL (1978). Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro* **14**:11–22.

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR (1984). Serum free growth of human mammary epithelial cells: Rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5435–5439.

Harris H, Watkins JF (1965). Hybrid cells from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* **205**:640–646.

Harris M (1959). Essential growth factor in serum dialysate for chick skeletal muscle fibroblasts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **102**:468.

Harrison RG (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**:140–143.

Hart IR, Fidler IJ (1978). An in vitro quantitative assay for tumor cell invasion. *Cancer Res.* **38**:3218–3224.

Hassell JR, Robey PG, Barrach HJ, Wilczek J, Rennard SI, Martin GR (1980). Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4494–4498.

Hayashi I., Sato GH (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* **259**:132–134.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**:585–621.

Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Fidler IJ (1987). A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett.* **38**:137–147.

Hoober JK, Cohen S (1967). Epidermal growth factor. I. The stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in chick embryo epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **138**:347–356.

House W, Shearer M, Maroudas NG (1972). Method for bulk culture of animal cells on plastic film. *Exp. Cell Res.* **71**(2):293–296.

Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S (2011). 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:1293–1304.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S-B, Muhlestein W, Melton DA (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnol.* **26**:1269–1275.

Huebner RJ, Todaro GJ (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**(3):1087–1094.

Huschtscha LI, Holliday R (1983). Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J. Cell Sci.* **63**:77–99.

Ichikawa Y, Pluznik DH, Sachs L (1966). In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**:488–495.

Illmensee K, Mintz B (1976). Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:549–553.

Ingber DE, Folkman J (1989). Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **109**:317–330.

Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**:83–87.

Jacobs JP (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**:168–170.

Jessell TM, Melton DA (1992). Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* **68**:257–270.

Keilova H (1948). The effect of streptomycin on tissue cultures. *Experientia* **4**:483.

Kew O, Sutter R, de Gourville E, Dowdle W, Pallansch M (2005). Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:587–635.

Kleinsmith LJ, Pierce GB (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **24**:1544–1551.

Knazek RA, Gullino P, Kohler PO, Dedrick R (1972). Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth in vitro. *Science* **178**:65–67.

Knedler A, Ham RG (1987). Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. *In Vitro* **23**(7):481–491.

Kohler G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495–497.

Kondo T, Raff M (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**:1754–1757.

Kortesmaa J, Yurchenco P, Tryggvason K. (2000). Recombinant laminin-8 (alpha4 beta1 gamma1); production, purification, and interactions with integrins. *J. Biol. Chem.* **275**:14853–14859.

Kruse PF Jr, Keen LN, Whittle WL (1970). Some distinctive characteristics of high density perfusion cultures of diverse cell types. *In Vitro* **6**:75–78.

Kruse RH, Puckett WH, Richardson JH (1991). Biological safety cabinetry. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:207–241.

le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**:4637–4650.

le Douarin NM (1963). Role of mesenchyme in hepatic histogenesis in the chick embryo (article in French). *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **257**:255–257.

Lee EY, Parry G, Bissell MJ (1984). Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *J. Cell Biol.* **98**:146–155.

Lee DR, Kaproth MT, Parks JE (2001). In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol. Reprod.* **65**:873–878.

Leffert HL, Paul D (1972). Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *J. Cell Biol.* **52**:559–568.

Lei Y, Schaffer DV (2013). A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differen-

tiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(52):E5039–E5048.

Leighton J, Mark R, Rush G (1968). Patterns of three-dimensional growth in collagen coated cellulose sponge: Carcinomas and embryonic tissues. *Cancer Res.* **28**:286–296.

Levi-Montalcini R (1966). The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* **60**:217–259.

Lewitzky M, Yamanaka S (2007). Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**:467–473.

Limat A, Mauri D, Hunziker T (1996). Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. *J. Invest. Dermatol.* **107**:128–135.

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* **372**:2023–2030.

Macpherson I, Montagnier L (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**:291–294.

Macpherson I, Stoker M (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* **16**:147.

Maniatis T, Hardison RC, Lacy E, Lauer J, O'Connell C, Quon D, Sim GK, Efstradiadis A (1978). The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* **15**:687–701.

Mareel M, Kint J, Meyvisch C (1979). Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **30**:95–111.

Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum AL (2003). Mouse round spermatids developed in vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol. Reprod.* **69**:169–176.

Masters JR, Alston-Roberts C, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Dirks WG, Freshney RI, Healy L, Kerrigan L, Kohara A, Korch C, MacLeod RA, Nakamura Y, Nims RW, Reid YA, Storts DR, Capes-Davis A (2012). Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature* **492**:186.

Medawar PB (1941). Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* **148**:783.

Metcalf D (1969). Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies. *J. Cell Physiol.* **74**:323–332.

Metcalf D (1990). The colony stimulating factors. *Cancer* **65**:2185–2195.

Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.* **10**:4239–4242.

Miller G, Lisco H, Kohn HI, Stitt D, Enders JF (1971). Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**:1459–1465.

Moore GE, Mount D, Tara G, Schwartz N (1963). Growth of human tumor cells in suspension cultures. *Cancer Res.* **23**:1735–1741.

Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967). Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**:519–524.

Morgan JE, Moore SE, Walsh FS, Partridge TA (1992). Formation of skeletal muscle *in vivo* from the mouse C2 cell line. *J. Cell Sci.* **102**:779–787.

Morgan JG, Morton HJ, Parker RC (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture; I: Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**:1.

Moscona AA (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* **3**:535.

Moscona AA, Piddington R (1966). Stimulation by hydrocortisone of premature changes in the developmental pattern of glutamine synthetase in embryonic retina. *Biochim. Biophys. Acta* **121**:409–411.

Moscona A, Moscona H (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* **86**:287.

Murray MR, Kopech G (1953). *A bibliography of the research in tissue culture, 1884–1950.* New York: Academic Press.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnol.* **26**:101–106.

Nelson JB (ed.) (1960). Biology of the pleuropneumonia-like organisms. *Ann. NY Acad. Sci.* **79**: 305.

Nelson-Rees, W. A., Daniels, D., & Flandermeyer, R. R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science* **212**:446–452.

Nelson-Rees W, Flandermeyer RR (1977). Inter- and intraspecies contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science* **195**:1343–1344.

Nurse P (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**:503–508.

Obata Y, Kono T, Hatada I (2002). Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells in vitro. *Nature* **418**:497.

Ohmichi H, Koshimizu U, Matsumoto K, Nakamura T (1998). Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development* **125**:1315–1324.

Okada TS. (1983). Recent progress in studies of the transdifferentiation of eye tissue in vitro. *Cell Differ.* **13**:177–183.

Parker RC (1961). *Methods of tissue culture*, 3rd ed. London: Pitman Medical, p. 47.

Parker RC, Healy GM, Fisher DC (1954). Nutrition of animal cells in tissue culture. VII. Use of replicate cell cultures in the evaluation of synthetic media. *Can. J. Biochem. Physiol.* **32**:306.

Peat N, Gendler SJ, Lalani N, Duhig T, Taylor-Papadimitriou J (1992). Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice. *Cancer Res.* **52**:1954–1960.

Peehl DM, Ham RG (1980). Clonal growth of human keratinocytes with small amounts of dialysed serum. *In Vitro* **16**:526–540.

Pollack, R. (1981). *Readings in mammalian cell culture*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Polatnick J, Bachrach HL (1964). Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microbiol.* **12**:368–373.

Politis M, Lindvall O (2012). Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med.* **10**:1.

Pontecorvo G (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somat. Cell Genet.* 1:397–400.

Pritchard DJ, Clayton RM, de Pomerai DI (1978). "Transdifferentiation" of chicken neural retina into lens and pigment epithelium in culture: Controlling influences. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **48**:1–21.

Puck TT, Marcus PI (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**:432–437.

Reid LM, Rojkind M (1979). New techniques for culturing differentiated cells. Reconstituted basement membrane rafts. In JakobyWB, PastanIH (eds.), *Methods in enzymology*, Vol. 57, *Cell culture*. New York, Academic Press, pp. 263–278.

Rothblat GH, Morton HE (1959). Detection and possible source of contaminating pleuropneumonia-like organisms (PPLO) in culture of tissue cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100**:87.

Rous P, Jones FAA (1916). A method of obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J. Exp. Med.* **23**:555.

Salk JE (1955). Considerations in the preparation and use of poliomyelitis virus vaccine. *J. Am. Med. Assoc.* **158**:1239–1248.

Sanford KK, Earle WR, Likely GD (1948). The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**:229.

Sanford KK, Westfall BB, Fioramonti MC, McQuilkin WT, Bryant JC, Peppers EV, Earle WR (1955). The effect of serum fractions on the proliferation of strain L mouse cells *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.* **16**:789.

Sato GH, Yasumura Y (1966). Retention of differentiated function in dispersed cell culture. *Trans. NY Acad. Sci.* **28**:1063–1079.

Sattler GA, Michalopoulos G, Sattler GL, Pitot HC (1978). Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res.* **38**:1539–1549.

Schaeffer WI (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:97–101.

Schwarz RI, Bissell MJ (1977). Dependence of the differentiated state on the cellular environment: Modulation of collagen synthesis in tendon cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:4453–4457.

Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A, Weinberg RA (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5714–5718.

Singh V (1999). Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* **30**:149–158.

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* **3**:2156–2165.

Sokol F, Kuwert E, Wiktor TJ, Hummeler K, Koprowski H. (1968). Purification of rabies virus grown in tissue culture. *J. Virol.* **2**:836–849.

Sorieul S, Ephrussi B (1961). Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells *in vitro*. *Nature* **190**:653–654.

Stoker MGP, Rubin H (1967). Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* **215**:171–172.

Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman B (1968). Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells. *Int. J. Cancer* **3**:683–693.

Strangeways TSP, Fell HB (1925). Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. I. The development of the undifferentiated limb-bud (a) when subcutaneously grafted into the post-embryonic chick and (b) when cultivated in vitro. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **99**: 340–366.

Strangeways TSP, Fell HB (1926). Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. II. The development of the isolated early embryonic eye of the fowl when cultivated in vitro. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **100**: 273–283.

Su X, Young EW, Underkofler HA, Kamp TJ, January CT, Beebe DJ (2011). Microfluidic cell culture and its application in high-throughput drug screening: Cardiotoxicity assay for hERG channels. *J. Biomol. Screen.* **16**:101–111.

Thompson EB, Tomkins JM, Curran JF (1966). Induction of tyrosine α-ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**:296–303.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145–1147.

Todaro GJ, Green H (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**:299–313.

Tuszynski MH, Roberts J, Senut MC, Gage FH (1996). Gene therapy in the adult primate brain: Intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration. *Gene Ther.* **3**: 305–314.

Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**:1031–1032.

Vunjak-Novakovic G (2006). Tissue engineering: Basic considerations. In Vunjak-NovakovicG, FreshneyRI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 132–155.

Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.) (2006). *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Waymouth C. (1959). Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB752/1). *J. Natl. Cancer Inst.* **22**:1003.

Webber DJ, Minger SL (2004). Therapeutic potential of stem cells in central nervous system regeneration. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **5**:714–719.

Wiktor TJ, Fernandes MV, Koprowski H (1964). Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. *J. Immunol.* **93**:353–366.

Wright KA, Nadire KB, Busto P, Tubo R, McPherson JM, Wentworth BM (1998). Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns* **24**:7–17.

Yaffe D (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**: 477–483.

Yasumura Y, Tashijian AH, Sato G (1966). Establishment of four functional clonal strains of animal cells in culture. *Science* **154**:1186–1189.

Yu J, Vodyanik MA, Kim Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Shulan Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R., Slukvin II, James A, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**:1917–1920.

（马 杰 章静波 译）

第 2 章

培养细胞的生物学

2.1　细胞培养环境

把体外培养的细胞当成是体内生理功能模型的合理性常受到人们的质疑。由于环境的改变，培养细胞通常不表现体内同类细胞的特征。另外，同一细胞系缺乏异质性和体内细胞的三维结构，并且激素和营养环境也发生了改变，因此，体外细胞的增殖不同于体内正常细胞，细胞与细胞、细胞与胞外基质的相互作用减弱，有利于非特化细胞铺展、迁移和增殖，但不利于表达分化特征。环境通过以下 5 条途径对培养细胞产生影响：①细胞生长的附着物或支持物性质，它们可以是固体（如单层细胞生长的塑料板），也可以是半固体（如胶原凝胶或琼脂凝胶），还可以是液体（如悬浮细胞的培养液）；②与其他细胞的接触程度；③培养基的理化性质和成分；④气相成分；⑤培养温度。合适的环境，包括附着物、营养、激素或生长因子的浓度、细胞间相互作用等是细胞表现特定功能的基础（参见 19.1 节、19.7 节）。

2.2　细 胞 黏 附

如果未发生转化和失去贴壁依赖性，绝大多数实体组织来源的细胞都以单层附着方式生长（参见 22.4.1 节）。组织分解或继代培养后，细胞需先附着并在基质上扩散，然后才能进行增殖（参见 12.5 节、23.9.2 节）。最早发现细胞可附着于带有微弱负电的玻璃上并进行扩散；后来又发现，某些塑料，如聚苯乙烯经过带电离子或高能电离辐射处理后，细胞也能附着其上。现在知道，细胞的黏附是通过特异的细胞表面受体与细胞外基质分子结合实现的，看来，在细胞铺展之前，细胞已分泌了细胞外基质蛋白和蛋白聚糖（参见 7.1 节、7.2 节、19.7.3 节）。细胞外基质先黏着到带电底面上，然后，细胞再通过特异的受体附着到基质上，因此，细胞曾经生长过的玻璃或塑料表面更适合细胞附着，用基质成分，如纤连蛋白、胶原或其衍生物（如明胶）预处理培养器皿，有利于要求复杂培养条件的细胞附着和增殖。

对纤维样细胞来说，其体外生长的关键是基质黏附和细胞铺展，它们在低密度时往往会发生迁移；而对上皮细胞而言，细胞生存和生长的最佳条件则是细胞间黏附，故它们往往呈斑块状生长。

2.2.1 细胞黏附分子

研究表明，4大类跨膜蛋白参与细胞-细胞间和细胞-基质间黏着（图2.1）。

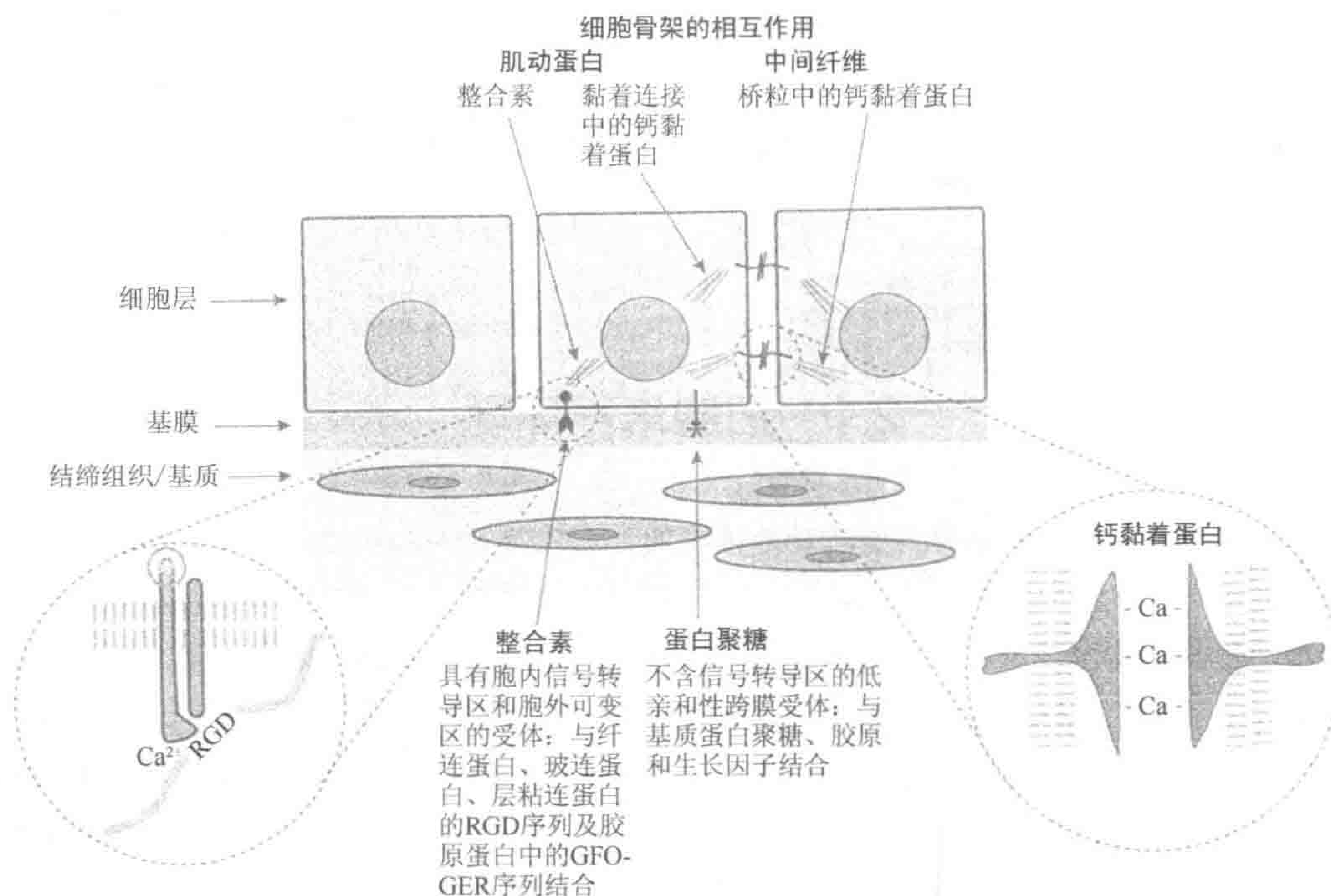


图2.1 细胞黏着。含纤维细胞的结缔组织上方的上皮细胞通过基膜与结缔组织隔开的图解。CAM和钙黏着蛋白主要参与类似细胞之间的相互作用，而整合素和蛋白聚糖可使上皮细胞附着到基膜基质上

（1）Ca^{2+}依赖性的钙黏着蛋白（cadherin），通过黏着连接（钙黏着蛋白E、N、P和VE）或细胞桥粒（桥粒芯糖蛋白、桥粒芯胶蛋白）参与同源细胞间的相互作用（Alberts et al.，2014c）。这些蛋白质分子具有同质性，即作用不同的细胞上的同源分子能彼此相互作用（Rosenman and Gallatin，1991）。钙黏着蛋白E、N、P、VE通过α-钙黏着蛋白、β-钙黏着蛋白、黏着斑蛋白和α-辅肌动蛋白与肌动蛋白骨架相连接，从而发挥信号转导及构建作用（Bakolitsa et al.，2004；Mège et al.，2006；Maddugoda et al.，2007；Kapus and Jamney，2013；Rogers et al.，2013）。胞桥小体通过血小板亲和蛋白、斑珠蛋白和桥粒斑蛋白与中间丝状体细胞骨架，以及钙黏着蛋白连接构成细胞间黏附连接，从而促进细胞分类并相互组合形成组织（Delva et al.，2009）。

（2）Ca^{2+}非依赖性的细胞黏附分子（CAM），如位于神经突触中的同嗜性神经细胞黏附分子（NCAM），以及分布在免疫突触中与整合素相互作用的异嗜性细胞间黏附分子（ICAM）。

（3）整合素（integrin），该分子通过含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（arginyl-glycyl-aspartic，RGD）序列的特殊基序与纤连蛋白、归巢素、层粘连蛋白等分子相互作用（Yamada and Geiger，1997），或通过甘氨酸-苯丙氨酸-吡咯赖氨酸-甘氨酸-谷氨酸-精氨酸（GFOGER）序列与胶原蛋白结合以介导细胞-基质间黏附（Barczyk et al.，2010；Knight et al.，2000）。整合素由一个α-亚基和一个β-亚基组成，由于两种亚基胞外结构域的高度多态性，造成了整合素种类的多样性。整合

素通过踝蛋白（Frame and Norman，2008；Zhang et al.，2008）、α-辅肌动蛋白、细丝蛋白和纽蛋白（Janssen et al.，2006；Thievessen et al.，2013）在黏着斑处（Alberts et al.，2014c）与肌动蛋白骨架相互作用，并在细胞黏附和铺展过程中将信息传递至细胞核，从而使细胞进入细胞周期。

（4）跨膜蛋白聚糖，该分子虽然也能与其他蛋白聚糖和胶原等基质成分相互作用，但不是通过RGD序列介导的。一些可溶性跨膜蛋白聚糖也可作为低亲和性生长因子受体（Yevdokimova and Freshney，1997；Forsren-Williams et al.，2008）以稳定和活化生长因子，并将生长因子转运到高亲和性受体上使其二聚体化（Schlessinger et al.，1995）。

第5类黏附蛋白是在紧密连接中发现的密封蛋白（claudin）和闭锁小带蛋白（occluden）。类似于钙黏着蛋白，它们属于同质性跨膜蛋白，借相邻细胞间的缝隙彼此紧密结合。它们与胞内骨架蛋白相互作用，进而与桥粒或黏附连接结构相互作用以促进细胞极性的建立。

2.2.2 细胞间连接

部分细胞黏附分子分散排列于细胞质膜上，但还有一部分黏附分子形成胞间连接结构。胞间的机械连接结构不同，其功能也不一样，如桥粒和黏附连接将上皮细胞紧紧聚在一起；紧密连接能封闭细胞间隙（如泡状腺或管状腺的分泌细胞之间、血管的内皮细胞之间）；缝隙连接则允许离子、营养分子和小分子信号物质（如cAMP）在相接触的细胞间传递（Alberts et al.，2014c）。桥粒在细胞相接触的胞膜区也有广泛分布（图 2.2a），黏附连接通常与紧密连接共分布在细胞侧面近顶部（图 2.2b）。

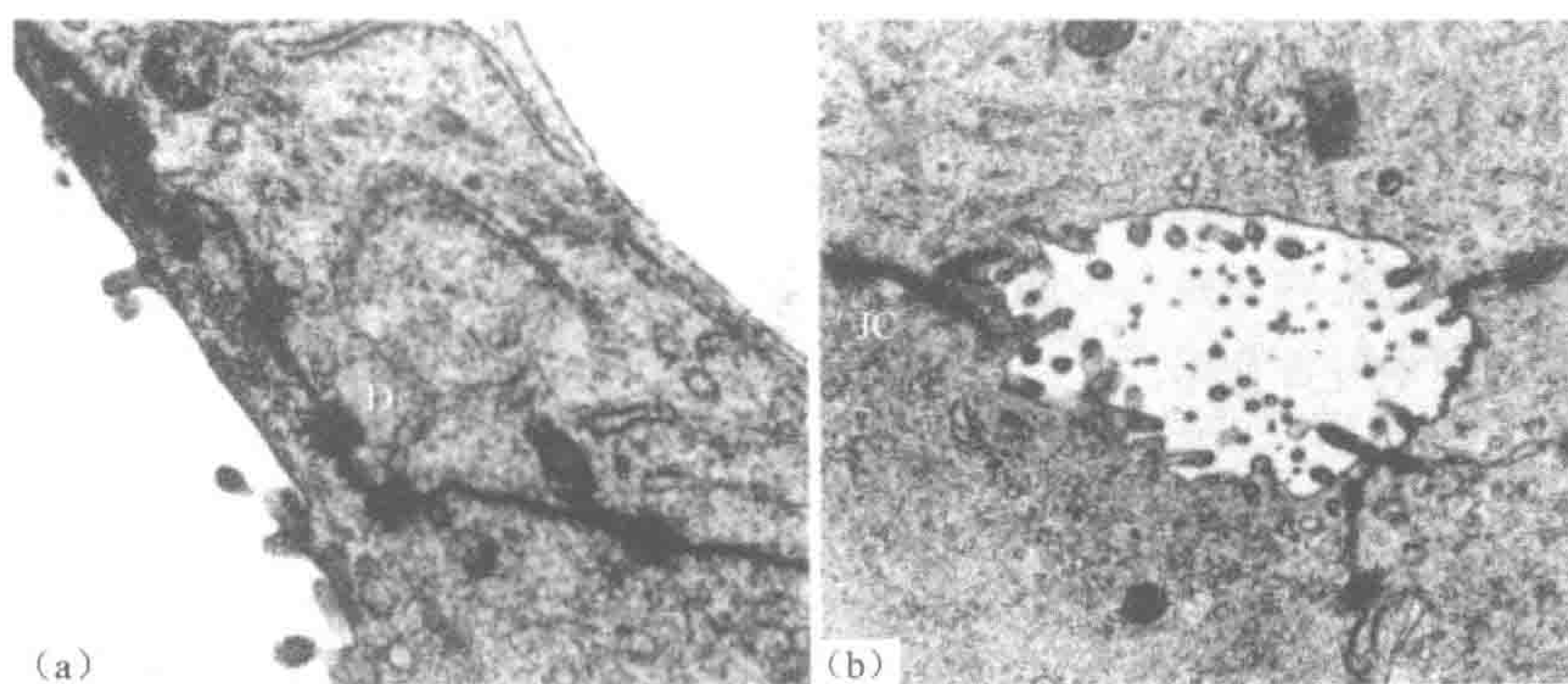


图2.2 细胞间连接。CA-KD细胞早期培养阶段的电子显微图像，这种细胞来自一种继发性脑腺癌（原发部位未知）。细胞生长在Petriperm培养皿中（Vivascience）。(a)两个相互接触细胞之间的桥粒（D），放大倍数28 000×；(b)显示含紧密连接（T）和连接复合物（JC）的小管腔，放大倍数18 500×（图片由Carolyn MacDonald提供）

上皮细胞在汇合培养中分化时，桥粒数量将会增加，当某一形态学组织出现时，黏附连接、紧密连接等连接结构均会形成。紧密连接的主要功能是封闭细胞间的缝隙，使那些从顶端侧向基底侧移动的分子以受调控的方式进行跨细胞转运，反之亦然。蛋白酶可消化细胞外基质，甚至通过降解跨膜蛋白的胞外区使组织细胞和培养的单层贴壁细胞彼此分离。上皮细胞一般不易解离，因为它们通过连接复合体（桥粒-黏附连接-紧密连接）使细胞结合在一起，而间充质细胞间结合更多地依赖基质的作用，所以容易分离。培养的内皮细胞，尤其是经基质长时间处理的培养器皿上生长的内皮

细胞有的也紧密连接，较难分离。钙黏着蛋白的同质连接，以及整合素受体与基质成分间的结合均有 Ca^{2+}和 Mg^{2+}双重依赖性。因此，通常要向胰蛋白酶中加入 EDTA 等螯合剂以促进细胞间的解离。

2.2.3 细胞骨架

细胞骨架主要包括以下 3 类成分（Alberts，2014b）。

（1）肌动蛋白或应力纤维。这是一类具有收缩性的结构性细丝，直径为 5~9nm，常常附着在细胞质膜和细胞核上，主要调控细胞形状和运动，并负责将结合于胞外基质上的整合素携带的信号传递至细胞核中，引起基因表达的改变。肌动蛋白细丝的密度和分布部位受到极性聚合和解聚的调控。当细胞开始分裂时解聚，在细胞分裂后铺展时重新聚合。



彩版 11

（2）中间纤维蛋白。这是一类刚性或半刚性纤丝，直径为 10nm，作为一类刚性骨架抵制肌动蛋白纤丝的收缩，从而参与调节细胞的形状。细胞类型不同，所含的中间纤维蛋白种类也不相同，如上皮细胞中主要是细胞角蛋白，而成纤维蛋白中主要是波形蛋白（参见 18.3.1 节，彩版 11a~c）。

（3）微管。这是一类直径最大的细胞骨架成分，直径为 24nm，其作用主要是介导细胞和细胞器的运动（de Forges et al.，2012）。在有丝分裂期间染色质沿着纺锤体中的微管进行迁移，而线粒体则主要分布在附着于微管上的细胞中。它们也可与肌动蛋白和中间纤维结合，参与细胞迁移中伪足的延伸。与肌动蛋白相似，微管的长度及分布受到极性聚合和解聚的调控，从而使细胞器在整个细胞质中进行转运。秋水仙碱、长春碱等微管蛋白聚合抑制子可通过抑制纺锤体的形成将细胞阻止在分裂中期，也可抑制细胞的迁移和浸润。

细胞黏附分子往往附着在细胞骨架成分上。整合素通过连接蛋白（linker protein）与肌动蛋白（actin）微丝相连，参与细胞表面和细胞核之间的相互通信（参见 2.2.1 节）。在黏着斑中，钙黏着蛋白与肌动蛋白细胞骨架相连，参与细胞形状及形态的改变（Maddugoda et al.，2007）；桥粒利用钙黏着蛋白通过细胞质斑与中间纤维（如细胞角蛋白 cytokeratin）相连，进而在细胞信号传递和细胞形态构建中发挥作用。

2.2.4 细胞外基质

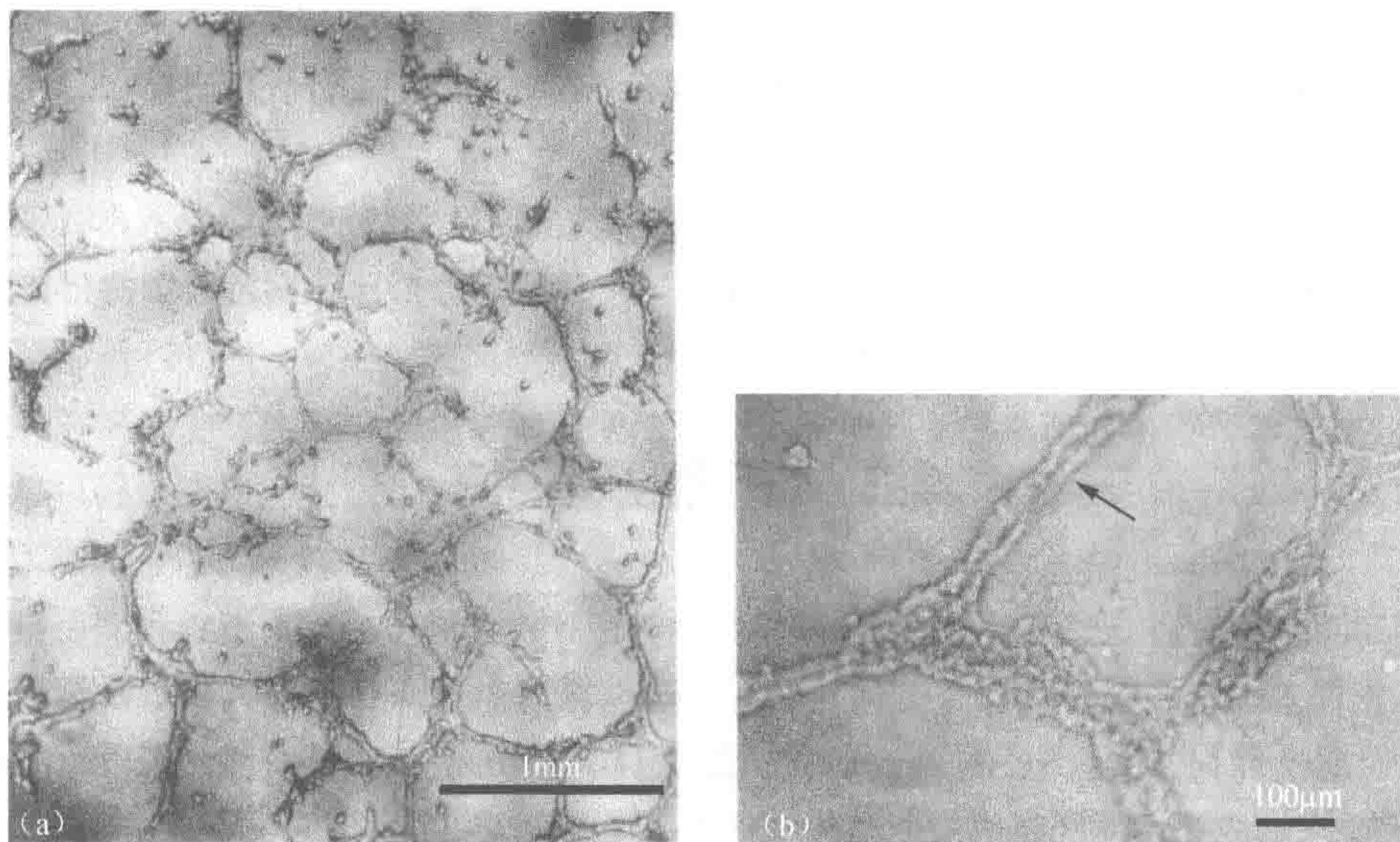
细胞外基质（ECM）分布在组织细胞的外部空间，其成分由细胞类型决定，如纤维细胞向胞外分泌 I 型胶原和纤连蛋白，上皮细胞则分泌层粘连蛋白。不同细胞类型边界处的分泌情况会发生变化，如真皮内的纤维细胞和表皮内的上皮胶质细胞毗邻处，两种细胞分泌的胞外基质成分形成基底层或基底膜（参见彩版 20e、f）。胞外基质的复杂性在调节附着其上的细胞表型方面起重要作用，附着在 ECM 上的细胞类型影响胞外基质组成，反过来，ECM 成分又影响细胞表型，二者之间处于动态平衡（Kleinman et al.，2003；Zoubiane et al.，2003；Fata et al.，2004）。因此，一个正在增殖的移行成纤维细胞需要有别于分化的上皮细胞或神经细胞的胞外基质成分。通常，培养细胞系可以产生自身所需的胞外基质成分，但一些特定细胞类型的原代培养、增殖及分化诱导需要外源性 ECM 的供给（Blow，2009；Lindner et al.，2010；Buck et al.，2014）。



彩版 20

细胞外基质由胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、透明质酸、蛋白多糖（如 β-聚糖、核心蛋白多

糖、基底膜聚糖和多配体聚糖-1）等各种成分组成，其中一些基质成分与生长因子或细胞因子结合（Brizzi et al.，2012）。基质可以通过胶原和纤连蛋白等纯化成分混合制备而成，也可由细胞直接分泌产生 ECM，然后冲洗掉产基质细胞，接种待研究的细胞（参见方案 7.1），或者由 Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤细胞直接产生胞外基质即可，也可以选择商品化的 Matrigel^{TM}（参见 7.2.1 节）。基质胶（matrigel）通常在细胞培养中用来促进细胞分化和细胞形态发生，它与上皮细胞或内皮细胞层交织成网格状结构（图 2.3，彩版 12c）。




彩版 12

图 2.3　生长在 Matrigel 上的 A549 腺癌细胞。（a）低倍镜下显示的是细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种 24h 后的网格形状；（b）高倍镜下显示的是以 1×10^5 个/mL 的细胞密度接种 3 天后的网格形状。箭头指示的是可能形成的小管（由 Jane Sinclair 提供；另见彩版 12c）

目前已确定，至少以下两种情况需要细胞与培养基相互作用：①黏附，实现细胞附着和铺展，这对细胞增殖十分必要（Folkman and Moscona，1978）；②特异性相互作用，这对某些特殊细胞功能的展现很有必要，如上皮细胞与基底膜、与胞外基质成分或与邻近组织细胞间的相互作用（参见 2.4.1 节、19.7.3 节）。Vlodavsky 等（1980）及其他研究者（Fata et al.，2004；Ito et al.，2014）研究了细胞在含有天然底物的培养基中的生长情况，发现天然基质（如基质胶、Matrigel^{TM}）和成分明确的基质大分子（胶原、层粘连蛋白、玻连蛋白）在某些情况下可作为重组蛋白，用于基质相互作用的对照性研究（参见补充材料附录III）。

ECM 成分能够提高细胞的生存能力，利于细胞的增殖和分化（Braam et al.，2008；Dame and Varani，2008；Domogatskaya et al.，2008）。但动物源性有害物质的引入十分危险，所以 ECM 中需添加重组蛋白（参见 9.1 节）。现在，市场上均有商品化的重组胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白出售（参见附录 II）。

2.2.5　细胞迁移

实时监控录像显示（参见 18.6 节）培养的细胞可在培养基中运动，这在巨噬细胞和粒细胞

中表现得最为明显。而在传代细胞中，在低细胞密度情况下（即细胞间没有接触），成纤维细胞的迁移能力最强，密集的单层上皮细胞迁移能力最弱。成纤维细胞以可辨识的极性运动方式进行迁移。肌动蛋白聚合形成的片状伪足（Pollard and Borisy，2003）附着在支持物上向运动方向延伸，与之相对的另外一端细胞膜开始缩回，从而引起细胞定向运动。一旦细胞与另外一个细胞相遇，极性即发生反转，细胞将反向迁移。胶体金痕迹技术显示（Scott et al.，2000），细胞迁移路线并不稳定，当密度达到汇合程度，细胞迁移即停止。达到汇合程度时细胞运动停止，同时细胞质膜褶皱减少，这种现象称为接触抑制，这最终使细胞退出细胞分裂周期（参见 22.4.2 节）。成肌细胞和内皮细胞迁移方式相似，而且同成纤维细胞一样，当达到汇合程度时，它们就依靠微环境开始分化。

发生转化的上皮细胞同极性单细胞一样呈随机迁移。接种密度较低的情况下，培养的细胞会一直运动直到与其他细胞接触，引起迁移停止。最后，细胞聚合成斑块状，斑块的整体形状反映了细胞协同运动的情况（Casanova，2002）。

2.3 细 胞 增 殖

2.3.1 细胞周期

细胞周期分为 M、G_1、S、G_2 4 个阶段（图 2.4）。在 M 期（M 是有丝分裂“mitosis”的缩写），染色质浓缩成染色体，组成染色体的两条染色单体分开，进入两个子细胞中。在 G_1 期（G 是间隙“gap”的缩写），细胞要么朝 DNA 合成方向发展，进入下一个细胞分裂周期，要么可逆地退出细胞周期，停留在 G_0 期（细胞分裂静止期），或不可逆地进入分化阶段。在 G_1 期存在一些限制点，它们具有控制细胞周期进程、决定细胞重新进入细胞周期或退出细胞周期进行分化的作用。紧接着 G_1 期之后是 S 期（即 DNA 合成期），DNA 在这个时期复制。S 期之后是 G_2 期，是细

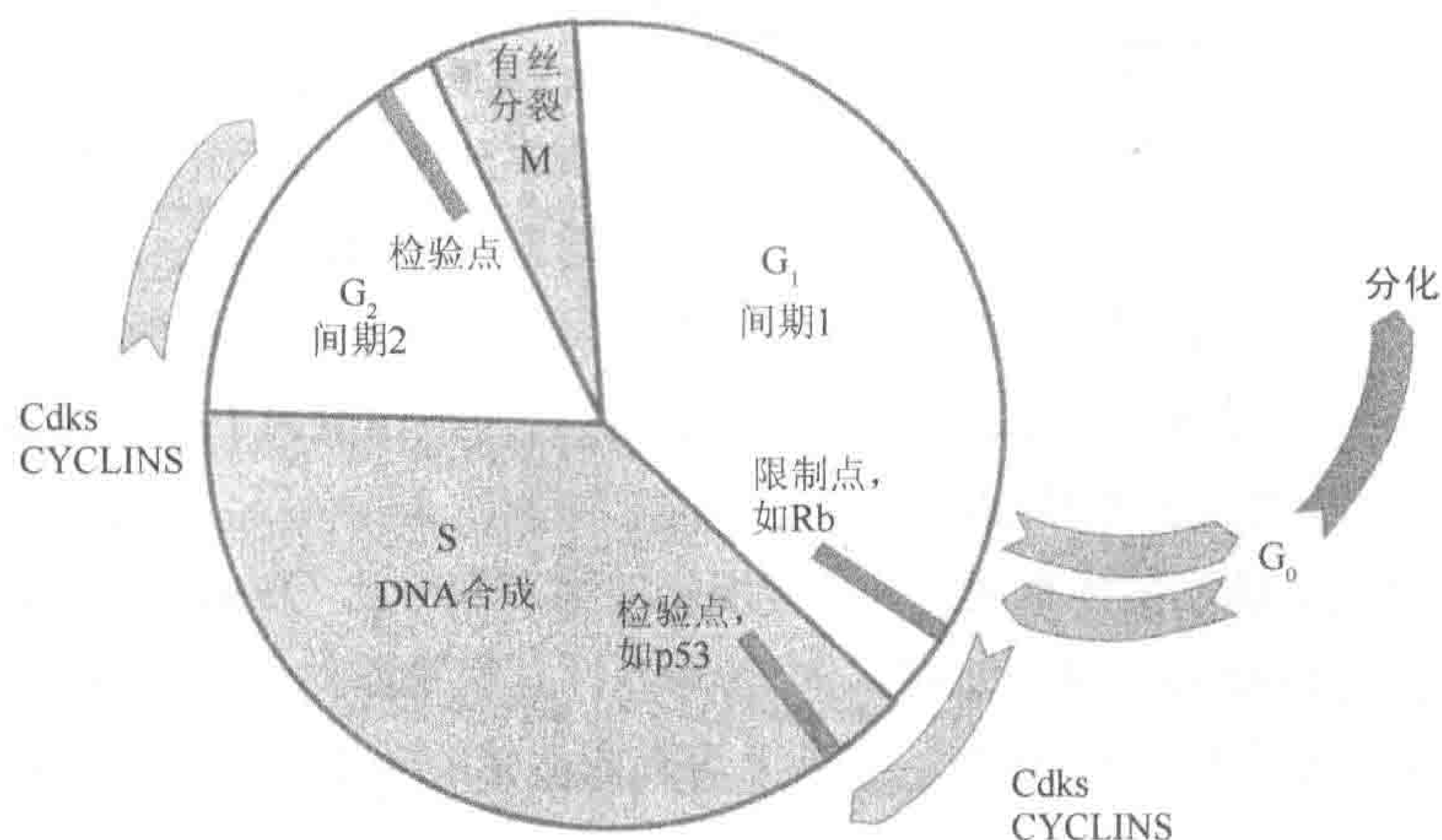


图 2.4 细胞周期。细胞周期分为 G_1、S、G_2、M 4 个时期。细胞周期的进程受细胞周期素依赖性激酶（Cdk）活化的细胞周期素的驱动。在 Rb 和其他细胞周期抑制因子的作用下细胞周期被阻滞在 G_1 限制点。依赖信号分子的性质，细胞也可暂时退出细胞周期进入 G_0 期，也可从 G_0 期再次进入细胞周期或朝分化方向进行。若检测到 DNA 损伤，那么细胞周期就会被 p53 等细胞周期抑制子阻滞在细胞周期的检验点

胞分裂前的准备阶段。DNA 合成起始检验点和 G_2 期检验点控制着 DNA 的完整性，并保证细胞周期中 DNA 修复的完成，若 DNA 不能被修复，细胞则发生凋亡。细胞凋亡，又称程序性细胞死亡（Al-Rubeai and Singh，1998），是一个受控制的生理过程，以清除群体中异常和受损的细胞。其特征包括 DNA 的片段性降解、核内染色质浓缩和边缘化、细胞皱缩等（参见彩版 17c、d），也能通过 Apotag 检测试剂盒（Oncor）或者 COMET 测定标记酶活性的方法检测细胞凋亡情况（Maskell and Green，1995）。


彩版 17

2.3.2　细胞增殖调控

细胞能否进入细胞周期受环境信号的调控。细胞密度低使得细胞周边不受约束、细胞可以任意铺展时，丝裂原生长因子，如表皮生长因子（EGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）或血小板衍生的生长因子（PDGF）与细胞表面受体相互作用，刺激细胞进入细胞周期（参见 8.5.2 节、9.4.5 节，表 9.4）。高细胞密度能抑制正常细胞增殖，但不能抑制变异细胞的增殖（参见 22.4.2 节）。细胞间接触可导致增殖抑制，细胞拥挤重叠及由此引起的细胞形状改变和细胞铺展能力降低则进一步加剧了增殖抑制。

细胞增殖受胞内正调节因子和负调节因子的共同调控。与生长因子结合引起的受体胞内结构域磷酸化可激活信号转导途径，使细胞周期素等正调节因子上调表达，进而加速细胞周期进程（McDonald and El-Deiry，2000；Reed，2003；Santamaria and Ortega，2006）（图 2.2）。负调节因子，如 p53（Schwartz and Rotter，1998）、p16 和 p21（Caldon et al.，2006）或 Rb 基因产物（Assoian and Yung，2008），将细胞周期阻滞于细胞周期限制点或检验点（Planas-Silva and Weinberg，1997）（图 2.5）。细胞膜受体和信号转导通路将细胞外调控元件（如 PDGF 等正调节因子，TGF-β 等负调节因子）与细胞内效应子联系起来，这一过程涉及蛋白质磷酸化，以及 cAMP、Ca^{2+}、二酰甘油等第二信使的参与（Alberts et al.，2014a，2014b，2014c）。研究肿瘤细胞的癌基因和抑癌基因表明，上述调控细胞增殖的许多步骤确有证据，这一结果有助于临床上寻找有效调控肿瘤细胞增殖的方法。而由此带来的直接益处是，较好地解释了为什么生长因子能调节培养细胞的增殖（McDonald and El-Deiry，2000）。这些研究也有助于鉴定增强细胞增殖的基因，其中有些基因可用于建立无限增殖细胞系（参见 22.3.2 节及短篇综述 22.1）。

2.4　细 胞 分 化

早期胚胎发育中内细胞团分化为 3 个胚层：①内胚层，进一步分化为肠上皮细胞及相关器官如肺、肝和胰腺；②外胚层，进一步分化为表面外胚层（表皮、口腔上皮、外子宫颈上皮）；③中胚层，进一步分化为胚胎间质，继而发育成结缔组织、支持组织，如骨组织、软骨组织、肌肉和血管组织（内皮细胞、平滑肌细胞和周细胞）及造血系统。在神经外胚层形成过程中，外胚层也可分化为神经外胚层，进而形成神经系统（中枢神经系统和外周神经系统及神经胶质）、部分神经内分泌细胞和黑素细胞。在胚胎器官发生中，源于原胚层的组织在分化过程中因相互诱导而联系。例如，在肺中相关间充质的诱导下，原肠胚内皮细胞分化形成气管、支气管和肺泡细胞，

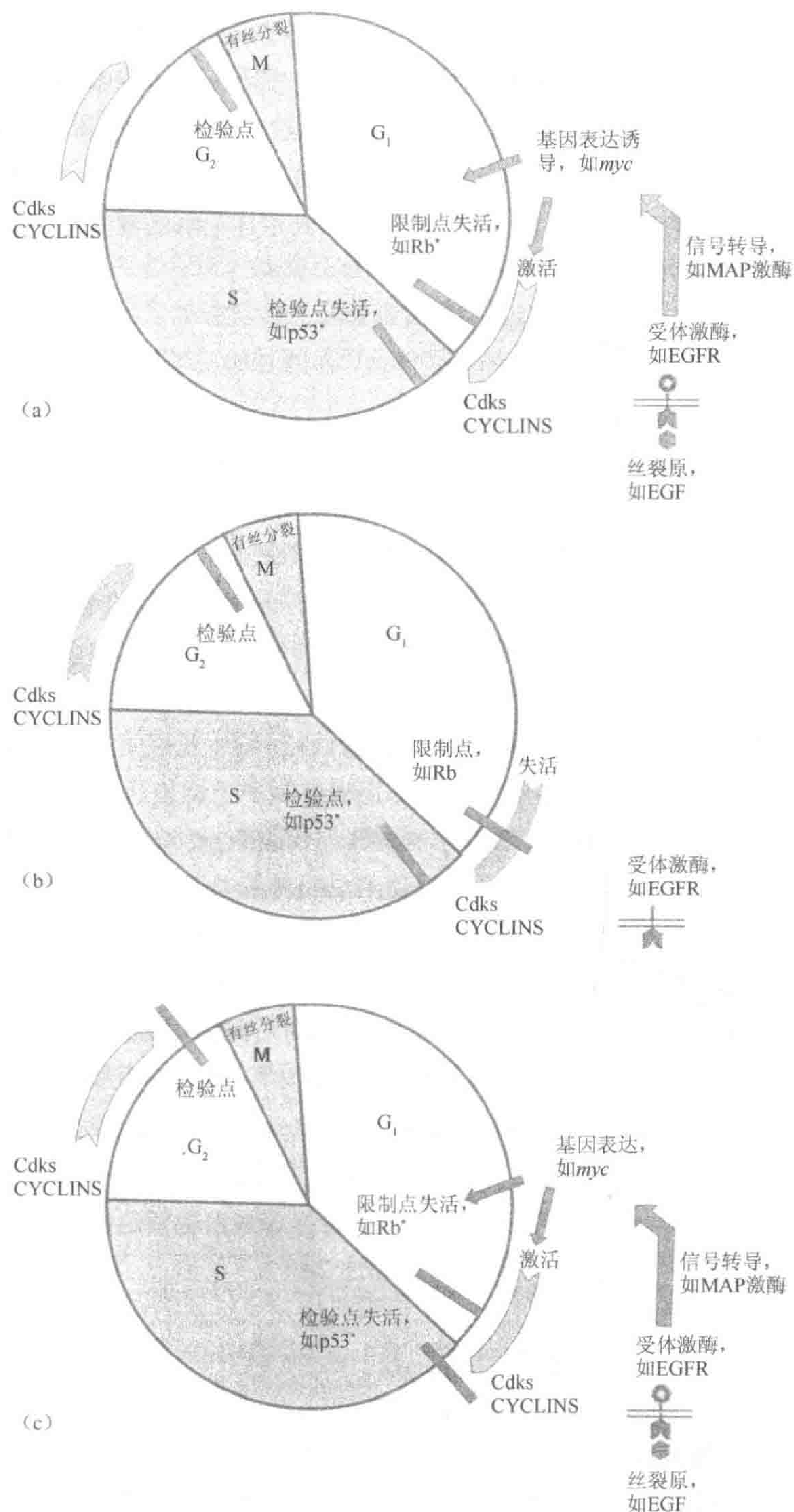


图 2.5　细胞周期进程及阻滞。(a) 细胞周期进程。受体激酶与丝裂原相互作用激活了胞质信号分子，并通过 MAPK 等胞内信号通路诱导 Myc 等正调控因子的表达；(b) 细胞周期阻滞。在 Rb 和其他细胞周期抑制因子的作用下细胞周期被阻滞在 G_1 限制点。依赖信号分子的性质，细胞也可暂时退出细胞周期进入 G_0 期。上述因子磷酸化失活时（如 Rb 磷酸化），细胞周期进程继续进行；(c) 若检测到 DNA 受损伤，细胞周期就会被 p53 等细胞周期抑制子阻滞在细胞周期检验点。p53 磷酸化（p53*）也会使细胞周期 (a) 继续进行

其中肺泡细胞具有内分泌、协调和呼吸功能。间充质细胞被内皮衍生细胞诱导形成纤维组织、弹性结缔组织和平滑肌。尽管大多数上皮细胞源自外胚层和内胚层，然而诸如肾小管上皮细胞和内衬于体腔的间皮细胞却最初来源于中胚层。

因此，不同器官由来源于不同胚层的组织构成。例如，皮肤由外层表皮（源自外胚层的上皮细胞）和下层真皮（源自中胚层的间充质细胞）组成，不同的细胞类型进一步形成组织，如结缔组织成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、真皮乳头的间充质细胞及其他细胞构成真皮组织。每种细胞类型都有自己相应的起源干细胞（参见 2.7.1 节），经过一系列增殖、分化形成树状分支结构（图 2.6）。树的每一分支可被视为一个细胞谱系，如表皮层基底细胞经过特定的分化路径形成角质化细胞。一些细胞谱系，如骨髓造血细胞系可进一步分支成多个细胞亚系（中性、嗜酸性和嗜碱性），因此血系标记物的表达情况也会受到细胞谱系分化过程中细胞位置等分化情况的影响（参见 19.2 节）。在血液、皮肤及肠道等组织中干细胞始终保持着再生能力，骨骼肌等组织除了损伤等异常情况外，正常情况下自我更新能力较弱，而神经元（除嗅觉神经外）根本无再生能力。

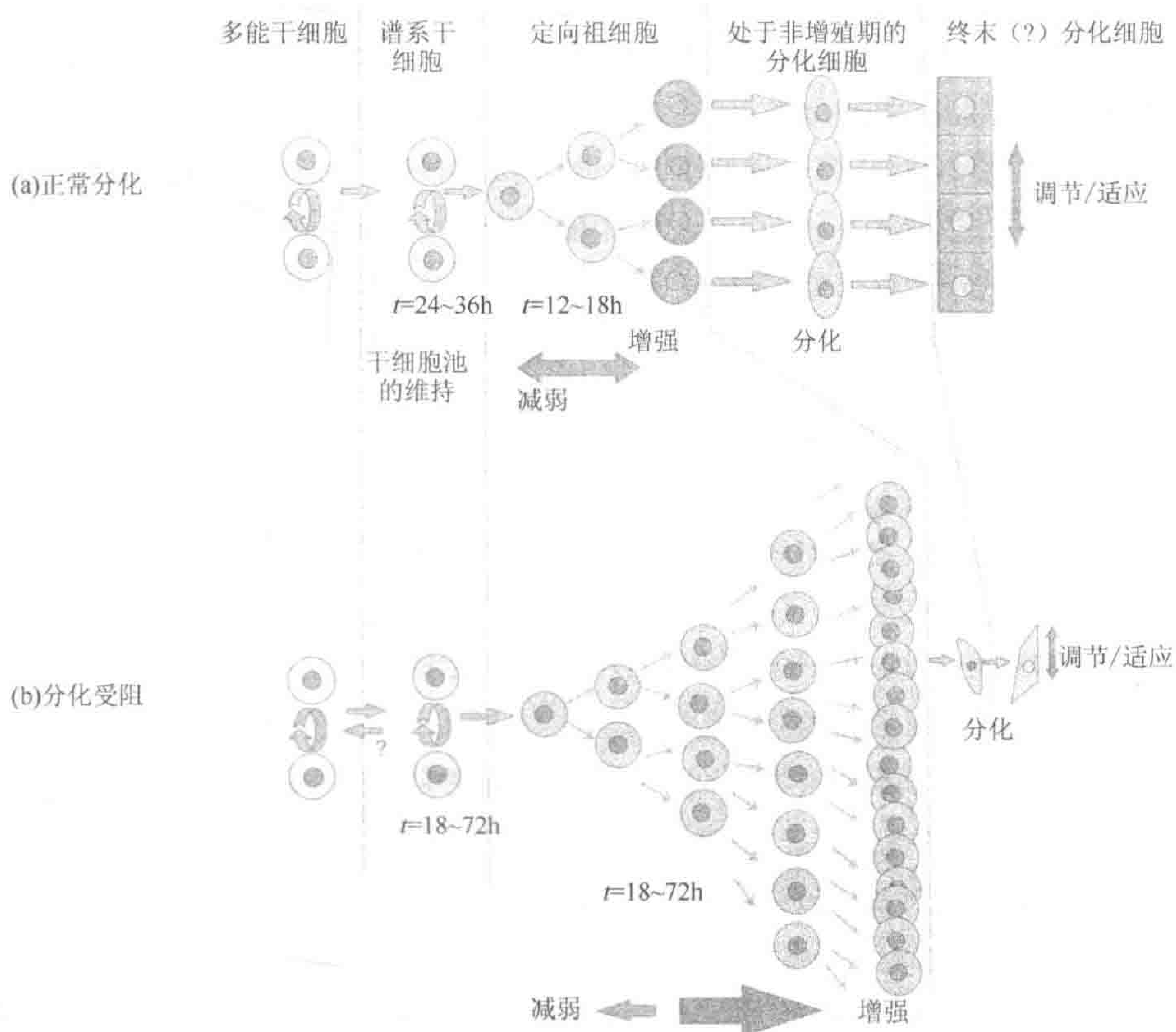


图 2.6 干细胞的分化。（a）在体内，少数干细胞产生一个具有增殖能力的祖细胞群，后者进而形成一个分化细胞群；（b）在体外，细胞分化受到增殖需求的限制；尽管干细胞仍可能存在，但祖细胞在体外培养的细胞中占优势。多能干细胞（最左端）可通过体外组织的培养获得，但它与组织干细胞的关系还不清楚。体外培养环境或者有利于组织中增殖祖细胞群的选择，或者诱导一定程度上分化的细胞恢复成祖细胞状态

正如 1.3.3 节中所提到的，在细胞培养中，细胞增殖能力的提高会限制培养细胞分化特征的出现（另见 19.3 节），但这对细胞系的繁殖及扩大保种很有必要。高细胞密度、细胞间及细胞与

基质间相互作用增强、培养基中各种分化因子的存在（参见 19.7 节）等细胞分化诱导环境一般会抑制细胞增殖，反之亦然。因此，如果需要进行细胞分化，首先有必要区分开这两种不同的培养条件，即一种适于细胞分化，另一种适于细胞增殖（图 2.7）。

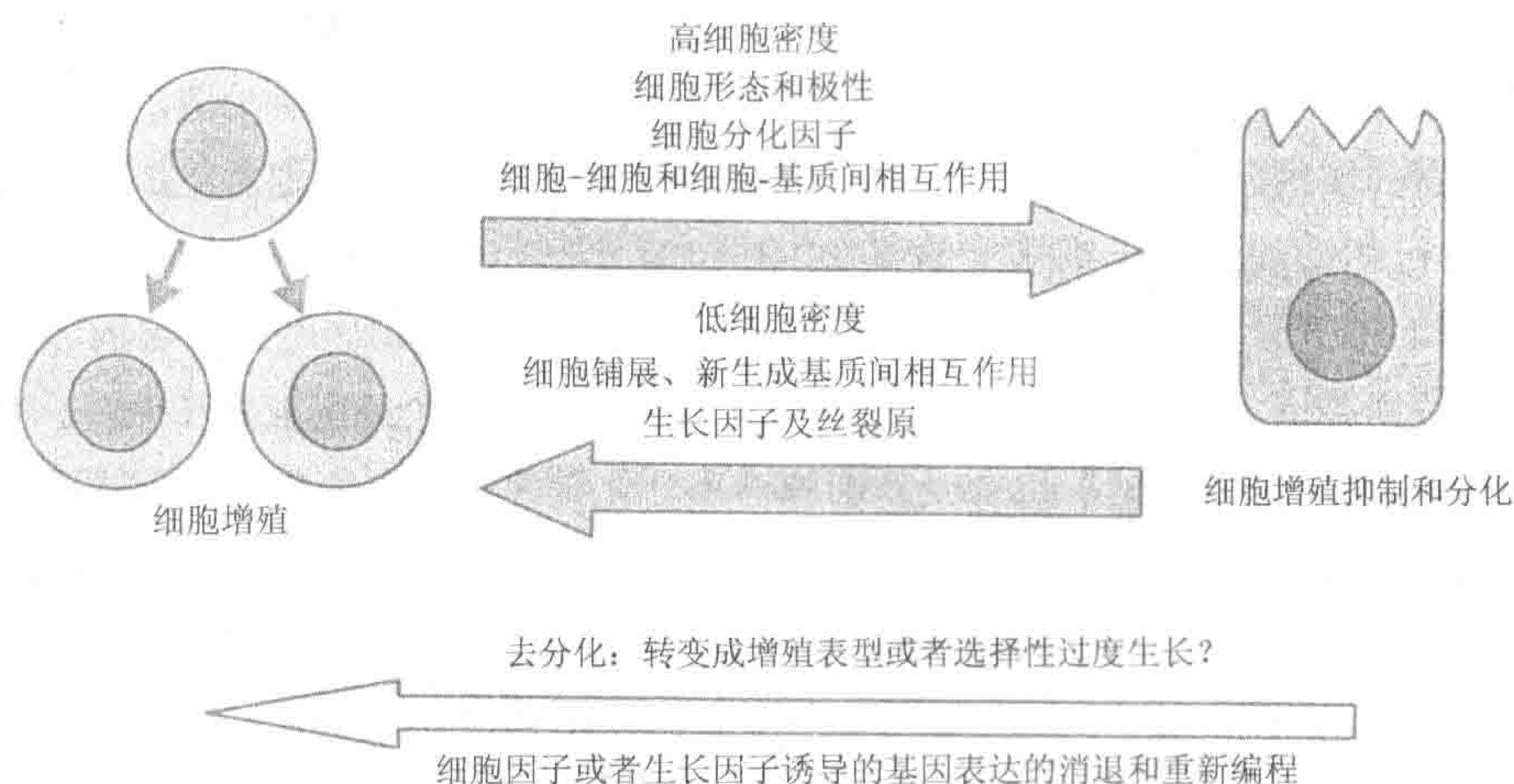


图 2.7 细胞分化与增殖。培养的细胞被认为处在细胞增殖与分化的平衡状态。正常的培养条件（低细胞密度、培养基中有血清生长因子等丝裂原）有助于细胞增殖，而高的细胞密度及分化因子的添加会诱导细胞分化。二者之间的动态平衡点取决于培养条件。培养细胞的去分化可能与生长因子或细胞因子的作用有关，这些因子诱导前体细胞产生显著的增殖表型或引发细胞过度生长。化学诱导或基因操控技术引起的基因表达的重新编程也可以将一个分化细胞转变成具有增殖能力的前体细胞或干细胞

2.4.1 细胞分化的诱导和保持

多年来人们早已认识到，如果能够在器官培养中保持组织的三维结构，那么细胞的特定功能就可以保持更长时间（参见 25.2 节）。不幸的是，器官培养不能传代，每次实验都得从头开始，而且，器官培养比细胞培养更难量化。鉴于这些原因，许多研究者试图通过灌注单层细胞培养物（参见 20.3 节、21.2.5 节）及营造培养细胞的体内环境条件和特定基质条件，如胶原凝胶、纤维素或明胶海绵，或从天然组织基质糖蛋白中得到相关物质，如纤连蛋白、软骨粘连蛋白和层粘连蛋白（参见 2.2.4 节、7.4.1 节、7.4.2 节、19.7.3 节）等来重建三维结构。许多商业化产品，其中最为著名的 Matrigel^{TM}（Corning）及其不含生长因子的改进型产品（GFR Matrigel）可供选用，虽然能再现细胞外基质的特性，但其作用仍未明确，故使用上还受到一定限制。但是，随着人们对同型细胞相互作用、细胞与基质间相互作用及异型细胞间相互作用的了解，创造适于保持培养细胞特定组织功能的条件大有希望。组织工程的开发和应用中对此大加重视（参见 20.4 节），并促进新型组织构架的开发，融入新型材料，如聚乳酸（PLA）、丝绸和陶瓷制品（Vunjak-Novakovic and Freshnsy，2006）。对一些组织的培养来说，还要求动态应力的存在，如对骨和软骨的压缩力（Schulz and Bader，2007; Elder and Athanasiou，2009）。对肌肉（Shansky et al.，2006）和肌腱（Kalson et al.，2011）的牵张应力，以及对心内皮细胞的搏动性流动冲击，这些对心肌的周期性活动十分必要（Niklason et al.，2001；Klinger and Niklason，2006）（参见 19.7.5 节）。

虽然在培养过程中细胞表型具有一定的可塑性（参见 2.4.2 节），但在目前技术水平上，在培养特殊细胞时（参见 16.1 节、17.4 节、25.1 节），选择正确的谱系仍很重要。正确的前体细胞的生长很可能会使分化诱导物成功地发挥作用（参见 19.7 节）。分化表型的表达也需要合适培养基的作用（参见 9.2 节），通常，在无血清选择培养基中加入合适的可溶性诱导物，如氢化可的松、视黄酸（RA）、细胞因子或平面极性成分（参见 19.7.2 节），可以保持培养细胞的分化特性。

2.4.2 细胞分化及去分化潜能

在过去，曾把体外培养的细胞不能表现出细胞在体内时特有的表型的现象称为去分化。根据此概念，去分化就是细胞在体外失去它们原有的特性。但以下情况常不好界定：①体外错误细胞系的选择；②同一谱系未分化细胞（图 2.6）快速生长后，最终形成增殖能力低下的分化细胞；③缺乏适宜的诱导物（激素、细胞或基质相互作用）导致细胞分化表征适应性、可逆性的丧失（参见 19.1.1 节）；④分化的细胞返回形成原始的表型，抑或形成干细胞。第 4 种情况已在肝中被发现，在部分肝切除后的肝再生过程中，完全分化的肝细胞经历去极化、增殖和再分化（Alison et al.，2004）。再者，曾被公认为形成少突胶质前体细胞的神经胶质前体细胞（少突胶质前体细胞，OPC），在骨成型蛋白 2 和骨成型蛋白 4（BMP-2、BMP-4）及纤维生长因子（FGF-2）诱导下还原成普通神经干细胞，之后再被诱导分化为胶质细胞或神经细胞（Kondo and Raff，2000）。最近研究表明，成人成纤维细胞可通过基因工程（Huangfu et al.，2008）或遗传（Nakagaw et al.，2007；Yu et al.，2007）干预处理被诱导成多能干细胞（图 2.8）。结果显示，在适宜的转录诱导物作用下，许多曾被认为是终末分化的细胞可能转变成祖细胞或干细胞状态。因此，去分化虽长期不流行，但或许能解释在细胞系培养过程中未分化细胞状态存在的原因。现在人们逐渐认识到，如果培养条件合适，许多不同类型细胞都可重新表现分化功能（参见 19.7 节）。令人吃惊的是，由于恶性肿瘤细胞的分化出现功能性障碍，许多转化细胞为诱导分化提供了最好的模板（表 2.1）。

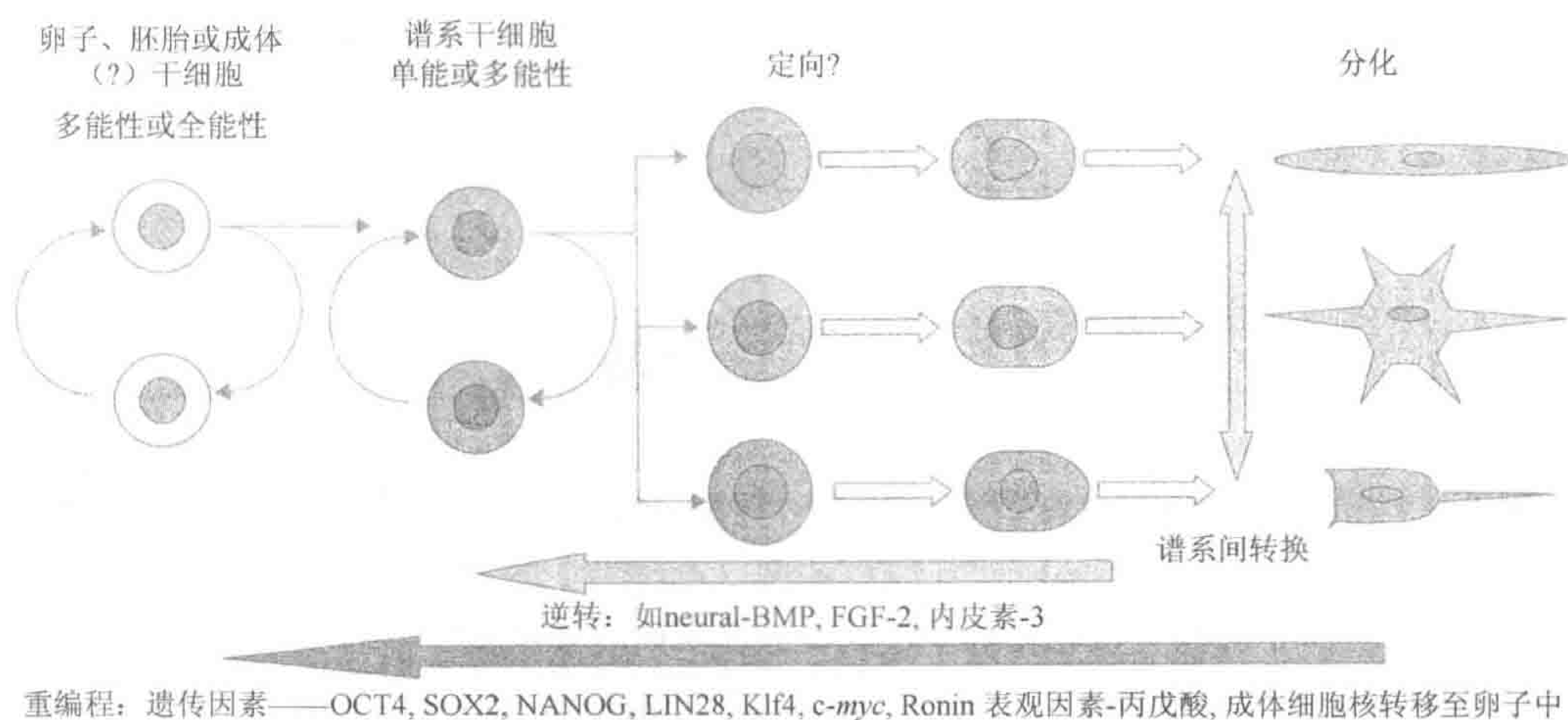


图 2.8 细胞定型和可逆性。粒细胞/骨髓干细胞、表皮细胞或神经干细胞等谱系干细胞经过一特定的定型途径产生一个或多个谱系。同时，多个定向分化的前体细胞有可能逆转成同一种谱系干细胞或多能干细胞，甚至是全能干细胞

表 2.1 具有分化特征的细胞系

细胞类型	来源	细胞系	物种	标记物	参考文献
内分泌细胞	肾上腺皮质	Y-1	小鼠	肾上腺类固醇	Yasamura et al.，1966
内分泌细胞	垂体肿瘤	GH3	大鼠	生长激素	Buonassisi et al.，1962
内皮细胞	肺动脉	CPAE	牛	凝血因子Ⅷ，ACE[a]	del Vecchio and Smith，1981
内皮细胞	肝癌	SK/HEP-1	人	凝血因子Ⅷ	Heffelfinger et al.，1992
上皮细胞	肾	MDCK	狗	肾盂运输	Gaush et al.，1966；Rindler et al.，1979
上皮细胞	肾	LIC-PK1	猪	钠依赖性葡萄糖吸收	Hull et al.，1976；Saier，1984
上皮细胞	乳腺	MCF-7	人	α-乳清蛋白	Soule et al.，1973
神经胶质细胞	神经胶质瘤	MOG-G-CCM	人	谷氨酰胺合成酶	Balmforth et al.，1986
神经胶质细胞	神经胶质瘤	C6	大鼠	胶质原纤维酸性蛋白，GPDH	Benda et al.，1968
肝细胞	肝癌	H4-11-E-C3	大鼠	酪氨酸氨基转移酶	Pitot et al.，1964
肝细胞	肝		小鼠	氨基转移酶	Yeoh et al.，1990
角质形成细胞	表皮	HaCaT	人	角质化	Boukamp et al.，1988
白血病细胞	脾	Friend	小鼠	血红蛋白	Scher et al.，1971
黑素细胞	黑色素瘤	B16	小鼠	黑色素	Nilos and Makarski，1978
骨髓细胞	白血病	K562	人	血红蛋白	Andersson et al.，1979a，1979b
骨髓细胞	骨髓瘤	若干种	小鼠	免疫球蛋白	Horibata and Harris，1970
骨髓细胞	骨髓	WEH1-3B D+	小鼠	表型	Nicola，1987
骨髓细胞	白血病	HL60	人	吞噬作用四氮唑蓝还原	Olsson and Ologsson，1981
肌细胞	骨骼肌	C2	小鼠	肌管	Morgan et al.，1992
肌细胞	骨骼肌	L6	大鼠	肌管	Richler and Yaffe，1970
神经内分泌	嗜铬细胞瘤	PC12	大鼠	儿茶酚胺类；多巴胺；去甲肾上腺素	Greene and Tischler，1976
神经细胞	成神经细胞瘤	C1300	大鼠	神经突	Lieberman and Sachs，1978
Ⅱ型肺细胞或 Clara 细胞	肺癌	A549	人	表面活化剂	Giard et al.，1972
		NCI-H441	人	表面活化剂	Brower et al.，1986
Ⅱ型肺细胞	肺癌		小鼠	表面活化剂	Wilkenheiser et al.，1991
各种细胞类型	胚胎畸胎瘤	F9	小鼠	PA，层粘连蛋白，Ⅳ型胶原	Bernstine et al.，1973

a 血管紧张素转换酶

2.5 细胞信号转导

本章在上一节已经提到，体内细胞的增殖、迁移、分化和凋亡均受细胞间、细胞与基质间相互作用及营养条件和激素等信号分子的调控（参见 2.4.1 节）。细胞黏附分子相互作用可传递信息（参见 2.2 节），同时扩散性、可溶性分子也能介导某些信息的传递。信号分子通过体内脉管系统从一种细胞转移到另一种组织细胞中发挥作用，这一过程称为内分泌；不通过血液而直接作用于同类型细胞，称为同型旁分泌或 homocrine（图 2.9），以下简称为“旁分泌”。由细胞自身合成并通过与自身受体结合作用于细胞自身的信号物质称为自分泌信号物质。

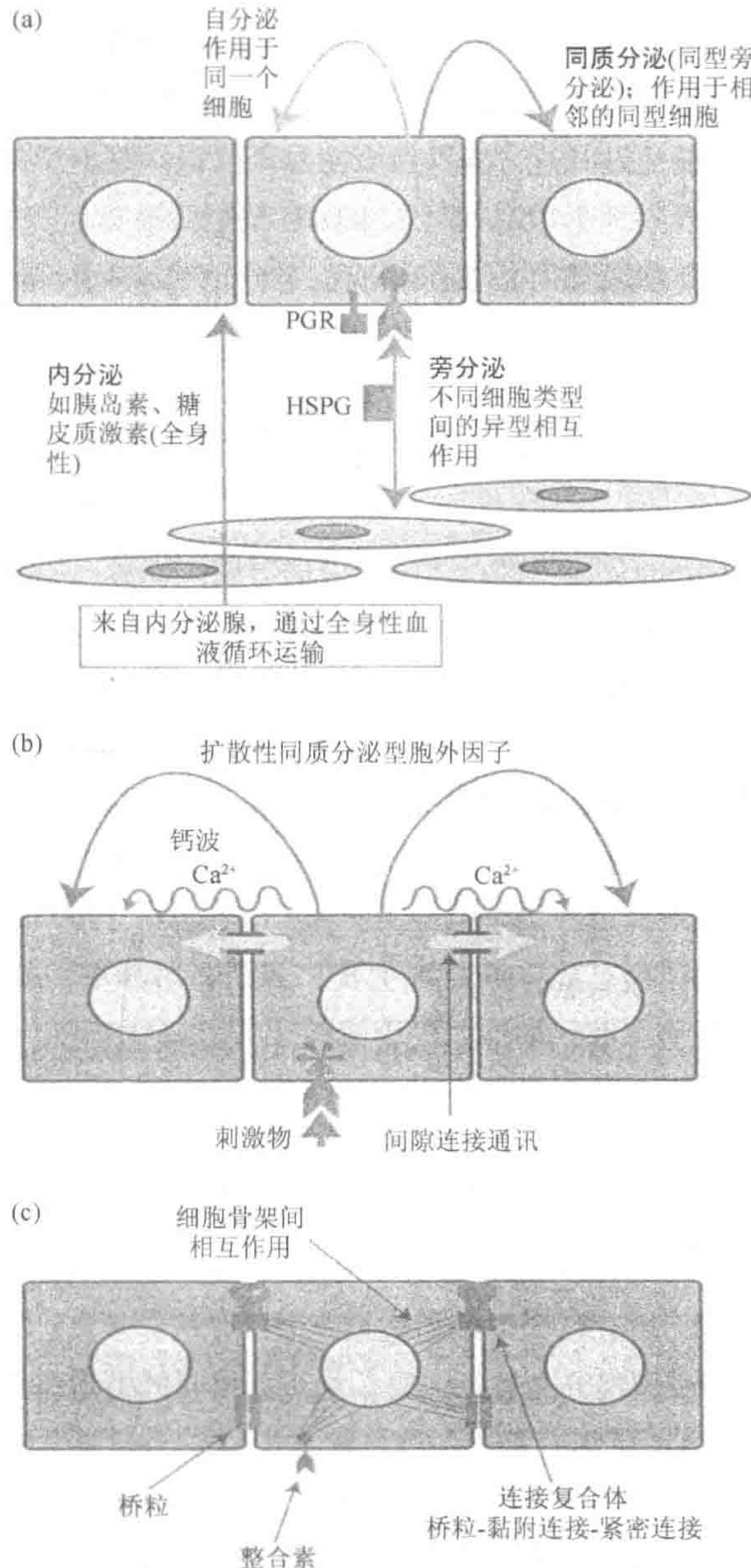


图 2.9 细胞相互作用及信号转导。细胞间相互作用途径：(a) 可溶性因子包括血管系统中的内分泌激素、来自相邻的非同型细胞分泌的旁分泌激素、来自相邻的同型细胞分泌的旁分泌物质及细胞自身分泌的自分泌因子。基质、可溶性分子和细胞相关的硫酸肝素蛋白聚糖（HSPG）等分子有利于维持旁分泌因子的活性、稳定和转运；(b) 间隙连接通讯、钙信号转导和被刺激细胞合成的同型分泌因子能提高靶组织应答的一致性；(c) 接触效应还包括连接复合体和桥粒与整合素一起通过细胞骨架传递信号，从而稳固细胞的位置、形状和极性

这些类型的细胞信号传递方式在体内都存在，而在体外，在具有基本培养基的常规条件下，只有自分泌和同型旁分泌两种方式。在低细胞密度条件下，很多培养基不能有效地接种细胞，部分归因于一种或多种自分泌或同型旁分泌信号物质被稀释，这就是为什么要选择条件培养基（参见 16.2.2 节）或饲养层（参见 16.2.3 节）来提高接种效率。功能特异性细胞生存、增殖的维持，

以及分化诱导需要旁分泌和内分泌信号分子，所以需要向分化培养基中添加合适的信号物质（参见19.7.2节）。但是，它们功能的发挥不仅仅是两个或多个协同作用那么简单（如McCormick and Freshney，2000）。因此，需要通过补充外源性旁分泌物质来促进细胞间相互作用，同时我们要考虑到细胞表型、合成的物质及物质合成时间会因为相互作用而改变。至少，培养细胞分泌异质型物质可能是一种为形成合适的基质微环境提供相应信号分子的简单的方法。现在我们可通过封闭抗体、反义RNA技术分析信号分子与细胞间的相互作用情况。

2.6 能量代谢

大多数培养基含4~20mmol/L葡萄糖，主要作为糖酵解的碳源，以乳酸为终产物。在正常的培养条件下（大气氧和浸没于溶液之下时），氧气供应常相对不足，如果缺乏合适的氧载体如血红蛋白时，升高氧分压将产生对细胞有毒的自由基，因此，常把O_2含量保持在大气水平，这就形成了厌氧条件下以糖酵解为能量来源（Danes and Paul，1961；Mulukutla et al.，2010）的细胞培养，也是由胰岛素（Paul and Pearson，1960）增加所致。尽管如此，柠檬酸循环仍然活跃，氨基酸，特别是谷氨酰胺（Gln）能作为碳源，通过酶氧化成谷氨酸，并通过转氨作用形成2-酮戊二酸进入柠檬酸循环（Reitzer et al.，1979；Bulter and Christie，1999）。谷氨酰胺的脱氨作用会产生氨，氨对细胞是有毒的，而且能限制细胞生长。因此在培养基（如Invitrogen公司生产的Glutamax培养基）中加入某些二肽，如谷氨酰丙氨酸或谷氨酰甘氨酸，具有减少氨生成的优点，另外它们在培养基中也比较稳定。

2.7 培养细胞的起源

大多数人是在标准环境下用有限和连续细胞系开展工作的，所以，考虑培养物中的细胞成分非常重要。细胞在诱导条件下表现分化特征，要么意味着培养的细胞是成熟的，保持其持续合成特殊蛋白质的能力就够了；或者意味着培养细胞由前体细胞或干细胞组成，这些细胞有增殖能力，并维持未分化状态，当有了合适的诱导条件，其中的一些或全部细胞成熟并分化。有指导意义的建议是，把培养物看作多能干细胞、未分化的定向前体细胞和成熟细胞处于平衡状态（图2.6），并且这种平衡可随环境条件变化而改变。在细胞密度较低的情况下，连续传代可促进细胞增殖和限制细胞分化，而高细胞密度、低血清和合适的激素条件可以促进细胞分化，抑制细胞增殖（图2.5）。

培养细胞的来源决定以后形成的培养物的细胞组成。因此，从胚胎获得的细胞系比来源于成熟组织的细胞系包含有相对多的干细胞和前体细胞，有更强的自我更新能力。另外，从体内不断更新的组织（如表皮、肠上皮、造血细胞）获得的细胞培养物仍可能含有干细胞，在适当的条件下，它们将有较长的生命极限。但那些来源于在应激条件下才更新的组织，如成纤维细胞、肌肉、神经胶质的培养物，可能只含有一些生命极限明确、能进行定向分化的前体细胞。因此，鉴定培养的细胞时，不能只局限于体内的细胞类型（造血细胞、肝细胞、神经胶质细胞等），还得考虑其所处的生长阶段（干细胞、定向前体细胞或成熟的分化细胞）。通常，细胞似乎很难改变其在

细胞系中的地位（转分化），但是，小鼠畸胎瘤及一些从低等脊椎动物获得的细胞例外，这些细胞能改变它们在细胞系中的地位，甚至在一些情况下，这种改变是可逆的。

在培养过程中，从肿瘤得到的细胞不遵循上述规则。例如，大鼠肝癌细胞在体外增殖，并仍能表现一些分化特性，但它们越接近正常细胞的表型，细胞增殖就受到越强的抑制。虽然，细胞在细胞系中的地位与增殖的关系或许并不密切，但并不是没有关联。例如，在高密度、低增殖率时，B16 黑色素瘤细胞产生的黑色素较多。

2.7.1 培养的开始

本书第 11 章（参见 11.1 节）详细叙述了原代培养技术。简单地说，培养物可从培养的组织块外迁细胞中获得，也可通过酶或机械方法分散组织获得。不管采用何种方法获得细胞，原代培养首先是一系列细胞选择过程的第一步（表 2.2），其最终结果是产生一个相对均一的细胞系。在原代外植体中（参见 11.3.1 节），细胞从外植体中迁移出来的能力是选择的条件；而对分散的细胞来说，只有那些在离散后生存下来并黏附到了培养器皿底面上的细胞，或悬浮时能存活的细胞才会成为原代培养的基础。

表 2.2 细胞系构建的选择过程

阶段	影响选择的因素	
	原代外植体	酶分离
细胞分离	机械损伤	酶消化伤害
原代培养	外植体黏附；向外生长（迁移）； 细胞增殖	细胞附着和铺展； 细胞增殖
第一次继代培养	胰蛋白酶敏感性；营养素、激素和培养底物限制；增殖能力	
作为细胞系繁殖	不同细胞的相对生长速度；细胞系的选择性过度生长； 营养、激素和培养底物限制； 细胞密度对正常或转化细胞表型优势的影响	
衰老；转化	正常细胞死亡；转化细胞过生长	

如果原代培养能持续好几个小时，进一步的选择就会发生。其中，有增殖能力的细胞，其数目逐渐增多；有些细胞类型存活了下来，但不增多；有的细胞在特定的培养条件下不能存活。因此，在培养中，各种类型细胞的相对比率会发生变化，如果是单层培养物，这种变化将持续到支持物被完全铺满为止。现在已经认识到，原代培养物虽可用于细胞遗传分析等研究中，但由于它们的不稳定性，对于其他研究来说并不合适。整个培养过程中，细胞群都在变化，细胞内适应性修饰会持续发生，这样的话，培养细胞相对稳定阶段的选择就变得很困难。

当细胞汇合后（即可利用的生长空间均被占用，细胞彼此间紧密接触），那些对生长密度限制敏感的细胞（参见 22.4.2 节）就会停止分裂，而那些对密度抑制不敏感的转化细胞仍会继续生长，形成生长优势。因此，保持低细胞密度（如经常进行传代培养），有助于维持培养物如小鼠成纤维细胞正常表型（Todaro and Green，1963）。

在原代培养细胞中，尤其当细胞达到汇合程度时，细胞的一些特有功能表现得更为明显。在此阶段，培养的细胞与其母体组织细胞在形态上的相似程度最大，从而在一定程度上保持了细胞种类的多样性。继代培养中，为保持某些特定性状所需的构建选择性条件要满足以下几点要求：①能维持正确的细胞系；②有利于细胞系中细胞的增殖；③考虑到促进分化表型表达的诱导条件的后续应用。

2.7.2 细胞系的演化

经过第一次继代培养或传代后（图 2.9），原代培养物就被称为一个细胞系，并可再增殖和传代多次。在细胞的每次连续传代培养中，群体中能快速增殖的细胞会逐渐占据优势，而不能增殖或增殖缓慢的细胞会变得越来越少，这种现象在第一次传代后最明显。增殖能力的差异，加上抗胰酶消化和抗移植操作引起损伤能力等的差异共同决定了每种细胞在群体中的生长优劣（参见 12.1 节）。

尽管在以后的传代中选择和表型改变仍在持续，但到第三次传代时，培养物已变得比较稳定，具有顽强而快速增殖能力的细胞便成为其典型特征。在有血清、没有特定选择条件的情况下，来源于结缔组织的成纤维细胞或来自血管的间充质细胞常成为呈优势生长的培养物，并以这种方式建成了一些非常有用的细胞系，如人类胚胎成纤维细胞系 WI38（Hayflick and Moorhead，1961）和 MRC-5（Jacobs，1970）、幼仓鼠肾成纤维细胞 BHK21（Macpherson and Stoker，1962）、COS 细胞（Gluzman，1981）、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞（Puck et al.，1958）等（参见表 12.1），也许，其中最著名的是 L-细胞，它是通过用甲基胆蒽处理小鼠的皮下成纤维细胞获得的（Earl et al.，1943；Sanfad et al.，1948）。这种优势生长也是组织培养中遇到的难题之一，即如何才能阻止那些较脆弱或生长较缓慢的特定细胞，如肝细胞或表皮角质细胞的优势生长。上述问题很大程度上归咎于培养条件的不完善。现在，为保持多种特定细胞系，在选择性培养基和培养底物的使用（参见 9.2 节、第 25 章）方面，已取得了较大的进展（参见表 25.1，补充材料附录III）。

2.7.3 细胞的衰老

正常细胞的分裂次数有限。因此，源自正常组织的细胞系在经过固定次数的倍增后，细胞就会死亡，这一涉及多基因的由遗传因素决定的事件称为细胞衰老。现在认为，衰老是由端粒的 DNA 末端序列在每次细胞分裂中无法正常复制而逐渐变短造成的，结果是，端粒随着细胞分裂次数增加而不断缩短，最终细胞不能再分裂，这个过程代表了细胞的衰老过程（Bodner et al.，1998）。但是，生殖细胞、干细胞和转化细胞等细胞例外，这些细胞常通过表达能复制端粒 DNA 的端粒酶来延长细胞的寿命，甚至使生殖细胞和一些肿瘤细胞具有无限增殖能力（参见 22.3 节及短篇综述 22.1）。

2.7.4 连续细胞系的转化和建立

一些细胞系免于衰老进而形成连续细胞系（图 2.10）。一个细胞系的持续生长能力反映了它的遗传变异能力，使其通过了进一步的筛选。遗传变异通常涉及 *p53* 基因的缺失或突变。当 DNA

发生突变或端粒酶基因过表达时，*p53* 基因通常会阻止细胞周期的进程。人成纤维细胞在整个体外培养过程中一直保持其整倍性，即保持其染色体完整性，不会转化成连续细胞系（Hayflick and Morrhead，1961），然而，在小鼠成纤维细胞（称为原始中胚层前体细胞或许更为确切）及一些人和动物肿瘤细胞的培养过程中，其染色体很难保持整倍性，因此往往会形成连续细胞系。看来，细胞系的形成在于固有的遗传变异性，在连续细胞系中发现始终伴随着遗传不稳定性也不足为奇。许多人类连续细胞系的共同特征是出现了亚四倍体的染色体数目（图 2.11）。这种产生连续细胞系的细胞培养称为体外转化（*in vitro* transformation）（参见 22.4 节），此现象可自然发生也可因化学物质或病毒诱发产生（参见 22.3 节）。“转化”一词的使用颇为松散，不同的人有不同的理解。在这里，无限增殖是指细胞获得了永久的生存能力，而转化则意味着生长特性的转变，如锚定非依赖性、接触抑制丧失和生长的密度抑制等，但这并不意味着就一定与肿瘤发生有关（Yang et al.，1992）（参见 22.2 节、22.5 节）。

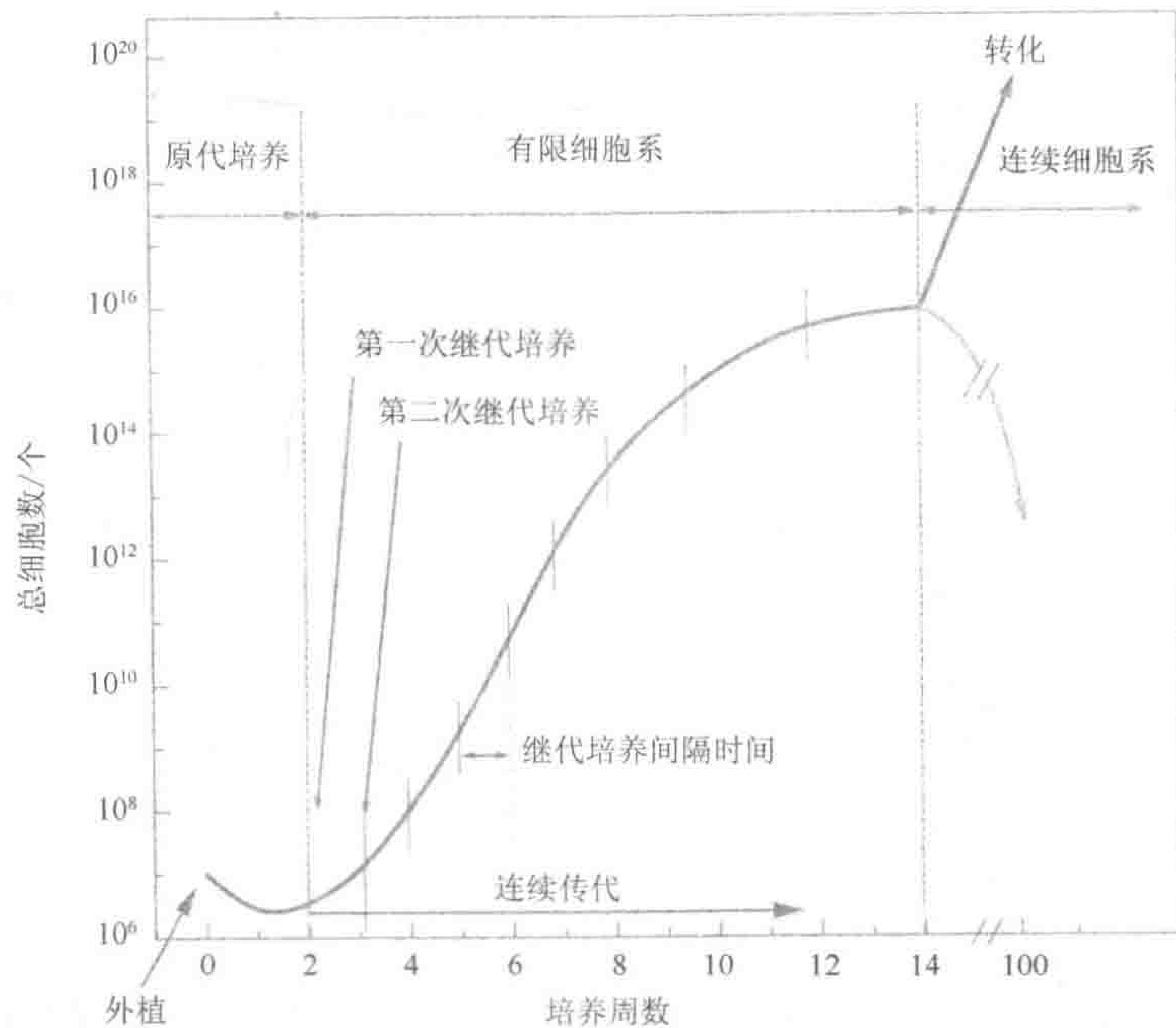


图 2.10　细胞系的演化。纵轴（纵坐标）代表某一细胞培养物中细胞的总生长情况（假设细胞数量在传代过程中不减少），用对数表示细胞总数（细胞产量）；水平轴（横坐标）表示线性的培养时间。虽然图中显示连续细胞系在第 14 周形成，实际上细胞类型不同，连续细胞系形成的时间也不同。同样，衰老的时间也不同。对于人二倍体成纤维细胞来说，衰老和死亡极有可能发生在 30~60 代，或第 10~20 周（根据倍增时间推算）。使用的术语和定义参阅词汇表（据 Hayflick and Moorhead，1961）

连续细胞系通常都是非整倍体细胞，染色体数目一般都介于二倍体和四倍体之间（图 2.11）。在培养的异倍体细胞群中，细胞之间的染色体数目和结构通常有很大差异（另见 22.2.2 节），至今还不清楚这种连续细胞系的细胞是来自外移的少数细胞，还是由一个或几个细胞转化而成，后一种说法在细胞生长动力学上似乎更易解释，因为连续细胞系一般都在细胞培养后期，在某一种细胞呈优势生长很长一段时间之后才出现。然而，也有这样一种可能，那就是在培养物中存在一个易于转化的细胞亚群，而亚群之外的其他细胞则无此倾向。

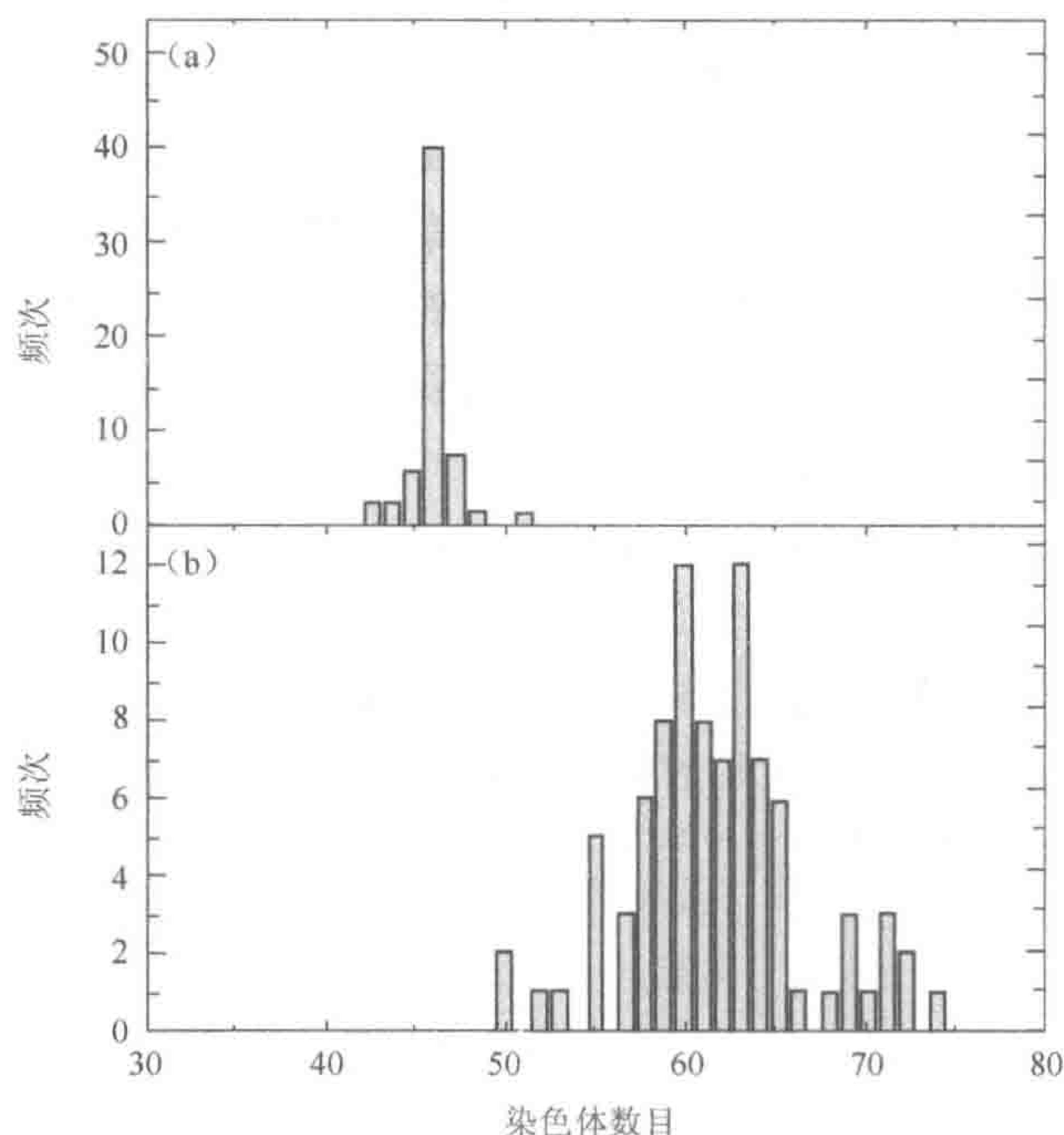


图 2.11　有限细胞系和连续细胞系的染色体数目。（a）正常的人胶质细胞系；（b）来自人黑色素瘤的连续细胞系

"转化"一词往往被用来描述一个连续细胞系的形成过程，部分原因是细胞经历了形态和动力学上的改变，还有部分原因是连续细胞系的形成常伴随肿瘤发生概率的增加。连续细胞系的许多属性，如血清需求量减少、细胞生长的密度限制降低、能在半固体培养基上生长、非整倍性（另见表 22.1，彩版 14）等都与恶性转化有关（参见 22.4 节、22.5 节）。在化学或病毒诱导的转化细胞中也可观察到类似的形态学和行为学改变。

彩版 14

许多（尽管不是大多数）正常细胞不能产生连续细胞系，经典的例子是人成纤维细胞，这些细胞在整个生命周期中均保持染色体的整倍性，并将在危机期（一般在 50 代左右）停止分裂，停止分裂后还可以再存活 18 个月左右。人神经胶质细胞（Pontén and Westermark，1980）和鸡成纤维细胞（Hay and Strehler，1967）的行为十分相似。另外，随着培养技术的不断提高，表皮细胞的生存周期也在不断延长（Rheinwald and Green，1977；Green et al.，1979），并表现出一定的连续生长能力。P160-ρ 相关的卷曲蛋白激酶抑制子促进表皮角质形成细胞的增殖，并越过了正常接受的衰老极限（Chapman et al.，2010）（参见方案 25.1-Su）。不过也有报道称表皮角质形成细胞能自发永生化（Fusenig and Boukamp，1998；Allen-Hoffmann et al.，2000）。也许，这种连续生长与体内组织的自我更新及体外干细胞的成功增殖有关（参见 2.7 节、26.1 节）。

2.8 术语定义

本书使用的术语定义可在词汇表找到（参见附录Ⅱ）。但多年来，术语"细胞系"（cell line）和"细胞株"（cell strain）在使用上仍存有一些争议。本书中，我主要采用了由美国组织培养协会（ATCA，即现在的体外生物学学会）组建的委员会编制的术语定义（Schaeffer，1990），也就

是本书词汇表中给出的定义。在这些定义中，“原代培养”一词指的是从接种外植体或从组织中分离出的细胞接种到培养瓶、培养板或培养皿中直到第一次继代培养的这一段时间。在第一次继代培养后，培养的细胞就成了一个细胞系，若最后死于衰老，该细胞系就是一个有限细胞系；若发生永生化，就是一个连续细胞系。如果能通过克隆或物理选择从该细胞系中筛选出一个亚细胞系，那么该亚细胞系将会表现出某种特定属性，这就形成了细胞株。

这里，主要对两个术语出现了理解上的偏离。第一个是早期传代细胞系，可以是市场上出售的原代细胞，根据 Hayflick 给出的定义（Hayflick and Moorhead，1961），这意味着该细胞经历过一次继代培养。这一术语并不是 ATCA 定义的，正确的应该是早期传代细胞系或早期传代培养。第二个为术语细胞系和细胞株的使用。后面一个术语（即细胞株）被 Hayflick 用来描述一个有限细胞系，该细胞系虽传代多次但不发生转化（Hayflick and Moorhead，1961），尽管他更倾向于被 Parker 使用的“alter”一词而非“transformed”。Hayflick 将细胞系一词用于指代连续异倍体细胞，如 HeLa 细胞。Wikipedia 提供的“细胞系”定义类似 ATCA，但认为细胞系具有无限分裂潜能，但现实情况未必如此。这里没有一个绝对的衡量标准认为此命名优于彼命名，毫无疑问，这两套不同的术语体系会继续沿用下去。然而，在后面章节中我将会继续使用本节第一段提到的 ATCA 定义。

参考文献

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P (2014a). *Essential cell biology*, 4th ed. New York: Garland Science, pp. 525-555.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P (2014b). *Essential cell biology*, 4th ed. New York: Garland Science, pp. 565-601.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P (2014c). *Essential cell biology*, 4th ed. New York: Garland Science, pp. 694-702.

Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. (2004). Hepatic stem cells: From inside and outside the liver? *Cell Prolif.* **37**:1.

Allen-Hoffmann BL, Schlosser SJ, Ivarie CA, Sattler CA, Meisner LF, O'Connor SL (2000). Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J. Invest. Dermatol.* **114**:444-455.

Al-Rubeai M, Singh RP (1998). Apoptosis in cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**:152–156.

Andersson LC, Jokinen M, Klein G, Nilsson K (1979a). Presence of erythrocytic components in the K562 cell line. *Int. J. Cancer* **24**:5–14.

Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG (1979b). K562—a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **23**:143–147.

Assoian RK, Yung Y (2008). A reciprocal relationship between Rb and Skp2: Implications for restriction point control, signal transduction to the cell cycle and cancer. *Cell Cycle* **7**:24-27.

Bakolitsa C, Cohen DM, Bankston LA, Bobkov AA, Cadwell GW, Jennings L, Critchley DR, Craig SW, Liddington RC (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* **430**:583–586.

Balmforth AJ, Ball SG, Freshney RI, Graham DI, McNamee B, Vaughan PFT (1986). D-1 dopaminergic and beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase in a clone derived from the human astrocytoma cell line G-CCM. *J. Neurochem.* **47**:715–719.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**:269-280.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**:370.

Bernstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3899–3903.

Blow N (2009). Cell culture; building a better matrix. *Nat. Methods* **6**:619-620.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C-P, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**:349–352.

Boukamp P, Petrusevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A (1988). Normal keratinisation in a spontaneously immortalised, aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**:761–771.

Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, Lebrin F, Kats P, Hochstenbach R, Passier R, Sonnenberg A, Mummery CL (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells* **26**:2257-2265.

Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**(5):645-651.

Brower M, Carney DN, Oie HK, Gazdar AF, Minna JD (1986). Growth of cell lines and clinical specimens of human nonsmall cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.* **46**:798–806.

Buck LD, Inman SW, Rusyn I, Griffith LG (2014). Co-regulation of primary mouse hepatocyte viability and function by oxygen and matrix. *Biotechnol Bioeng.* **111**(5):1018-1027.

Buonassisi V, Sato G, Cohen AI (1962). Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:1184–1190.

Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2006). Cell

cycle control in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **97**:261-274.

Casanova JE (2002). Epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Confluence of membrane trafficking and motility in epithelial cell models. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**(5):G1015–G1019.

Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA (2010). Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J. Clin. Invest.* **120**:2619-2626.

Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJ (1999). Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol. Bioeng.* **66**(2):104-113.

Dame MK, Varani J (2008). Recombinant collagen for animal product-free dextran microcarriers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **44**:407-414.

Danes BS, Paul J (1961). Environmental factors influencing respiration of strain L cells. *Exp. Cell Res.* **24**:344-355.

de Forges H, Bouissou A, Perez F (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**:266-274.

Del Vecchio P, Smith JR (1981). Expression of angiotensin converting enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **108**:337–345.

Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**(2):a002543.

Domogatskaya A, Rodin S, Boutaud A, Tryggvason K (2008). Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro. *Stem Cells* **26**:2800-2809.

Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E (1943). Production of malignancy *in vitro*; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**:165–212.

Elder BD, Athanasiou KA (2009). Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: From chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* **15**:43-53.

Eschenhagen T, Zimmerman WH (2006). Engineered heart tissue. In Vunjak-NovakovicG, FreshneyRI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering.* Hoboken, NJ: Wiley, pp. 260-291.

Fata JE, Werb Z, Bissell MJ (2004). Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res.* **6**: 1–11.

Folkman J, Moscona A (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**:345–349.

Forsten-Williams K, Chu CL, Fannon M, Buczek-Thomas JA, Nugent MA (2008). Control of growth factor networks by heparan sulfate proteoglycans. *Ann. Biomed. Eng.* **36**:2134-2148.

Frame M, Norman J (2008). A tal(in) of cell spreading. *Nat. Cell Biol.* **10**:1017-1019.

Fusenig NE, Boukamp P (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **23**:144-158.

Gaush CR, Hard WL, Smith TF (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931–933.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik K, Parks WP (1972). *In vitro* cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**:1417.

Gluzman Y (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175–182.

Green H, Kehinde O, Thomas J (1979). Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5665–5668.

Greene LA, Tischler AS (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:2424–2428.

Hay RJ, Strehler BL (1967). The limited growth span of cell strains isolated from the chick embryo. *Exp. Gerontol.* **2**:123.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**:585–621.

Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, Taylor L, Darlington G (1992). SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**:136–142.

Horibata K, Harris AW (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.* **60**:61–77.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S-B, Muhlestein W., Melton DA (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**:1269-1275.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PKI. *In Vitro* **12**:670–677.

Ito A, Yamamoto M, Ikeda K, Sato M, Kawabe Y, Kamihira M. (2014). Effects of type IV collagen on myogenic characteristics of IGF-I gene-engineered myoblasts. *J. Biosci. Bioeng.* 119(5):596-603. PMID: 25454061.

Jacobs JP (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**:168–170.

Janssen ME, Kim E, Liu H, Fujimoto LM, Bobkov A, Volkmann N, Hanein D (2006). Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol. Cell.* **21**:271-281.

Kalson NS, Holmes DF, Herchenhan A, Lu Y, Starborg T, Kadler KE (2011). Slow stretching that mimics embryonic growth rate stimulates structural and mechanical development of tendon-like tissue in vitro. *Dev. Dyn.* **240**:2520-2528.

Kapus A, Janmey P (2013). Plasma membrane–cortical cytoskeleton interactions: A cell biology approach with biophysical considerations. *Compreh. Physiol.* **3**:1231-1281.

Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**:526–532.

Klinger RY, Niklason LE (2006). Tissue-engineered blood vessels. In Vunjak-NovakovicG, FreshneyRI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering.* Hoboken, NJ: Wiley, pp. 294-322.

Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW, Barnes MJ (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J. Biol. Chem.* **275**:35-40.

Kondo T, Raff M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**:1754–1757.

Liebermann D, Sachs L (1978). Nuclear control of neurite induction in neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* **113**:383–390.

Lindner U, Kramer J, Behrends J, Driller B, Wendler NO, Boehrnsen F, Rohwedel J, Schlenke P (2010). Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins. *Cytotherapy* **12**:992-1005.

Macpherson I, Stoker M (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* **16**:147.

Maddugoda MP, Crampton MS, Shewan AM, Yap AS (2007). Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* **178**:529-540.

Maskell R, Green M (1995). Applications of the comet assay technique. *Int. Microbiol. Lab.* **6**:2–5.

McCormick C, Freshney RI (2000). Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **82**:881–890.

McDonald ER 3rd, El-Deiry WS (2000). Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int. J. Oncol.* **16**:871-886.

Mège RM, Gavard J, Lambert M (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:541-548.

Morgan JE, Moore SE, Walsh FS, Partridge TA (1992). Formation of skeletal muscle *in vivo* from the mouse C2 cell line. *J. Cell Sci.*

102:779–787.

Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: New insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* **28**:476–484.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**:101–106.

Nicola NA (1987). Hemopoietic growth factors and their interactions with specific receptors. *J. Cell Physiol.* (suppl.)**5**:9–14.

Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanawala A, Sanzgiri S, Langer R (2001). Morphological and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J. Vasc. Surg.* **33**(3):628–638.

Nilos RM, Makarski JS (1978). Control of melanogenesis in mouse melanoma cells of varying metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **61**:523–526.

Olsson I, Ologsson T (1981). Induction of differentiation in a human promyelocytic leukemic cell line (HL-60). *Exp. Cell Res.* **131**:225–230.

Parker RC, Castor LN, McCulloch EA (1957). Altered cell strains in continuous culture. Special publications. *NY Acad. Sci.* **5**:303–313.

Paul J, Pearson ES (1960). The action of insulin on the metabolism of cell cultures. *J. Endocrinol.* **21**:287–294.

Pitot H, Periano C, Morse P, Potter VR (1964). Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vitro*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **13**:229–245.

Planas-Silva MD, Weinberg RA (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:768–772.

Pollard TD, Borisy GG (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453–465.

Pontén J, Westermark B (1980). Cell generation and aging of nontransformed glial cells from adult humans. In FedorofS, HertzL (eds.), *Advances in cellular neurobiology*, **Vol. 1**. New York: Academic Press, pp. 209–227.

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958). Genetics of somatic mammalian cells; III: Long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**:945–956.

Reed SI (2003). Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(11):855–864.

Reitzer LJ, Wice BM, Kennel D (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **254**:2669–2677.

Rheinwald JG, Green H (1977). Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human keratinocytes. *Nature* **265**:421–424.

Richler C, Yaffe D (1970). The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* **23**:1–22.

Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH Jr (1979). Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell Biol.* **81**:635–648.

Rogers CD, Saxena A, Bronner ME (2013). Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J. Cell Biol.* **203**(5):835-847.

Rosenman SJ, Gallatin WM (1991). Cell surface glycoconjugates in intercellular and cell-substratum interactions. *Semin. Cancer Biol.* **2**:357–366.

Saier MH (1984). Hormonally defined, serum free medium for a proximal tubular kidney epithelial cell line, LLC-PKI. In BarnesWD (ed.), *Methods for serum free culture of epithelial and fibroblastic cells*. New York: Alan R. Liss, pp. 25–31.

Sanford KK, Earle WR, Likely GD (1948). The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**:229.

Santamaria D, Ortega S (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: Lessons from genetically modified mice. *Front. Biosci.* **11**:1164–1188.

Schaeffer WI (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:97–101.

Scher W, Holland JG, Friend C (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells *in vitro*; I: Partial purification and identification of hemoglobins. *Blood* **37**:428–437.

Schlessinger J, Lax I, Lemmon M (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**:357–360.

Schulz RM, Bader A (2007). Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur. Biophys. J.* **36**:539-568.

Schwartz D, Rotter V (1998). P53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin. Cancer Biol.* **8**(5):325-336.

Scott WN, McCool K, Nelson J (2000). Improved method for the production of gold colloid monolayers for use in the phagokinetic track assay for cell motility. *Anal. Biochem.* **287**:343–344.

Shansky J, Chromiak J, Del Tatto M, Vandenburgh H (1997). A simplified method for tissue engineering skeletal muscle organoids in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **33**:659–661.

Shansky, J., Ferland, P., McGuire, S., Powell, C., DelTatto, M., Nackman, M., Hennessey, J., & Vandenburgh, H. H. (2006). Tissue engineering human skeletal muscle for clinical applications. In Vunjak-Novakovic, G., & Freshney, R. I. (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ, Wiley-Liss pp. 239–258.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Teterson WD, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50**:6075–6086.

Soule, H. D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**:1409–1416.

Thievessen I, Thompson PM, Berlemont S, Plevock KM, Plotnikov SV, Zemljic-Harpf A, Ross RS, Davidson MW, Danuser G, Campbell SL, Waterman CM (2013). Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J. Cell Biol.* **202**:163-177.

Todaro GJ, Green H (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**:299–313.

Vlodavsky, I., Lui, G. M., & Gospodarowicz, D. (1980). Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell* **19**:607–617.

Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.) (2006). *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Wilkenheiser KA, Vorbroker DK, Rice WR, Clark JC, Bachurski CJ, Oie HK, Whitsett JE (1991). Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11029–11033.

Yang J-H, Thraves P, Dritschilo A, Rhim JS (1992). Neoplastic transformation of immortalised human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* **52**:3478-3482.

Yasumura Y, Tashijian AH, Sato G (1966). Establishment of four functional clonal strains of animal cells in culture. *Science* **154**:1186–1189.

Yeoh GCT, Hilliard C, Fletcher S, Douglas A (1990). Gene expression in clonally derived cell lines produced by *in vitro* transformation of rat fetal hepatocytes: Isolation of cell lines which retain liver-specific markers. *Cancer Res.* **50**:75–93.

Yevdokimova N, Freshney RI (1997). Activation of paracrine growth factors by heparan sulphate induced by glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **76**:261–289.

Yu J, Vodyanik MA, Kim Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Shulan Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, James A, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**:1917-1920.

Zhang X, Jiang G, Cai Y, Monkley SJ, Critchley DR, Sheetz MP (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.* **10**:1062-1068.

Zoubiane GS, Valentijn A, Lowe ET, Akhtar N, Bagley S, Gilmore AP, Streuli CH (2003). A role for the cytoskeleton in prolactin-dependent mammary epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* **117**:271–280.

（徐存拴　译）

第3章

实验室设计及布局

若要新建、大修改造或者装修实验室，需要有合理的规划，且必须与建筑管理部门联络沟通。这通常由当地政府（城市、地区或州）部门监督管理；方案一般由设计师或者机构性地产和规划部门制定。同时，也要遵守地方和国家的安全规程。在美国，相关规程可以从疾病控制中心（CDC）、美国国家卫生研究院（NIH）及职业安全和健康管理局（OSHA）等机构获取，在英国和澳大利亚可分别从卫生与安全管理局和基因技术监管机构部门获取相关的信息。实验室负责人的职责是直接与机构性地产和规划部门或者设计团队联络，以确保相关的安全规程落实到位，同时还要考虑到这些规程会不会影响实验室的工作。

3.1 布局、陈设和服务设施

无菌是组织培养实验室不同于其他大多数实验室的主要要求。一般来说，无菌条件并不是说要花很多钱去创造一个很大的无菌区域，重要的是组织培养实验室能够防尘和不设立通道。使用层流罩［现在普遍称为生物安全柜（BSC）］是创造无菌条件的简便方法，若位置合适，还可将非专业实验室内的空间利用起来（参见 3.2.2 节、4.2.1 节、5.2.1 节）。布局取决于工作方式、规模和使用人数（图 3.1~图 3.4），但实验室布局要遵循一般原则。各房间设计得要方便清洁，最好在墙体与天花板之间或者墙体与地板之间有一圆形拱，避免难以清理的缝隙存在。设备应稳固放置在地板上，设备基底部要留有一个弧形拱弯；或者牢固吊在操作台上，操作台下面要留有一定的空间以便于清洗。地板上要覆盖一层乙烯基丙烯酸涂料或其他防尘材料，在铺设时要有一定坡度，并略向远离消毒柜的门外侧的地漏倾斜。这种设计便于必要时用水冲洗地板，更重要的是能防止蒸馏器、高压蒸汽灭菌锅或水槽的水溢到地板上时对仪器设备造成损坏。

一般来说，设备的放置应该遵循如下原则，产生制造小股气流或灰尘的设备应该放置在尽可能远离无菌工作区的位置。因此，压缩机能产生气流的冰箱、冷藏柜等设备要远离生物安全柜（BSC），而细胞计数板和显微镜要放置在离生物安全柜较近的位置，这也是目前普遍使用的布局方式。如果一个细胞培养室在使用时封闭、无冷却，那么冰箱可以放在靠近生物安全柜的地方。如果所有相关活动必须在同一个房间内完成（图 3.1），那么洗涤区、装瓶区和消毒区应该设在房间的另一端，远离生物安全柜的地方；从外面带进来的物品，如钢瓶、液氮（LN_2）罐应放在门口附近，即远离生物安全柜的另外一头。

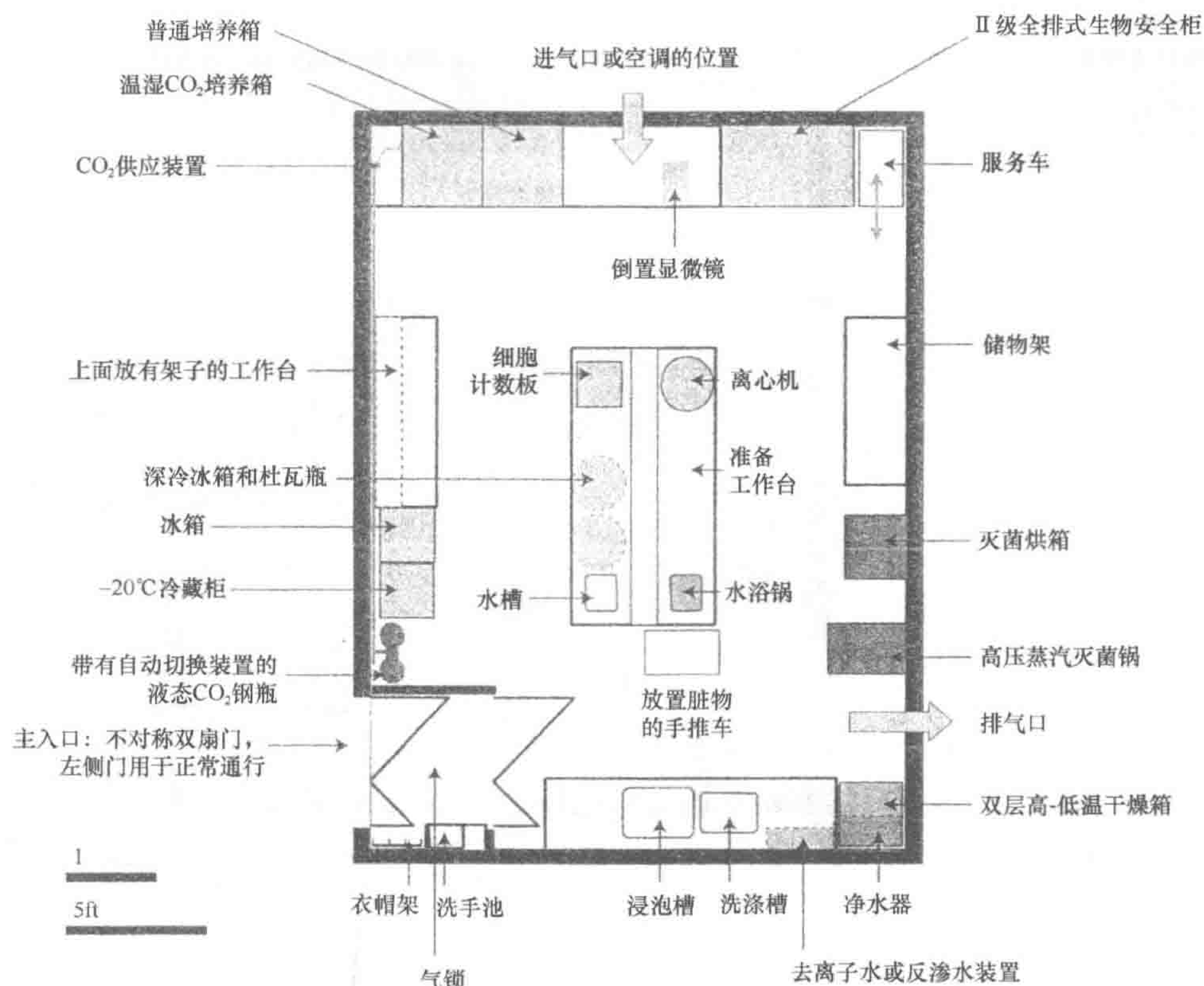


图 3.1 小型组织培养实验室。适于 2~3 人使用的简易的组织培养实验室布局情况。深色区代表可移动的设备；浅色区代表固定的或可移动的器具。1ft=0.3048m。比例尺 1∶100

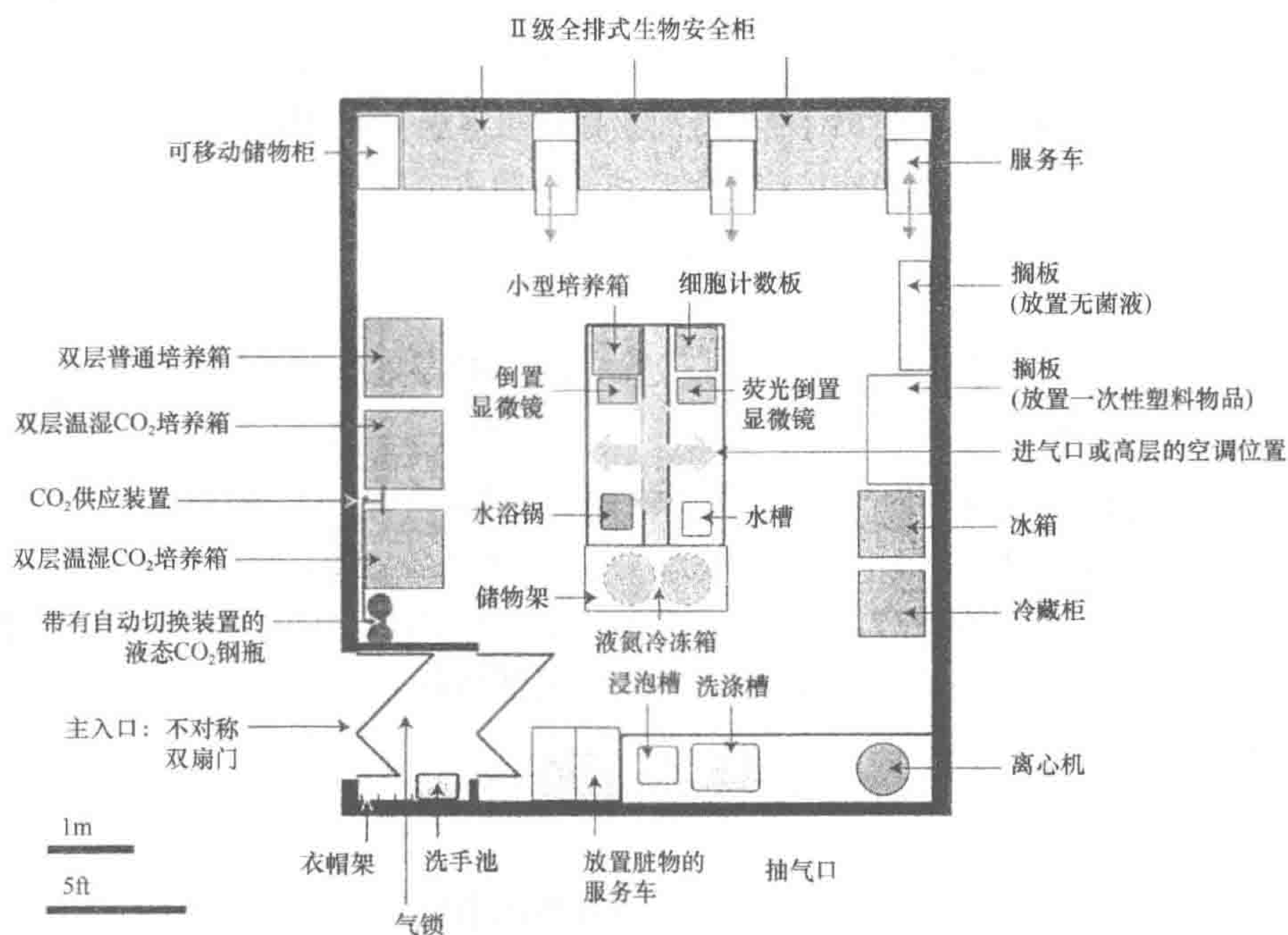


图 3.2 中型组织培养实验室。适于 5~6 人的带洗涮和准备室的组织培养实验室布置情况。深色区代表可移动仪器设备；浅色区代表固定的或可移动的器具。1ft=0.3048m。比例尺 1∶100

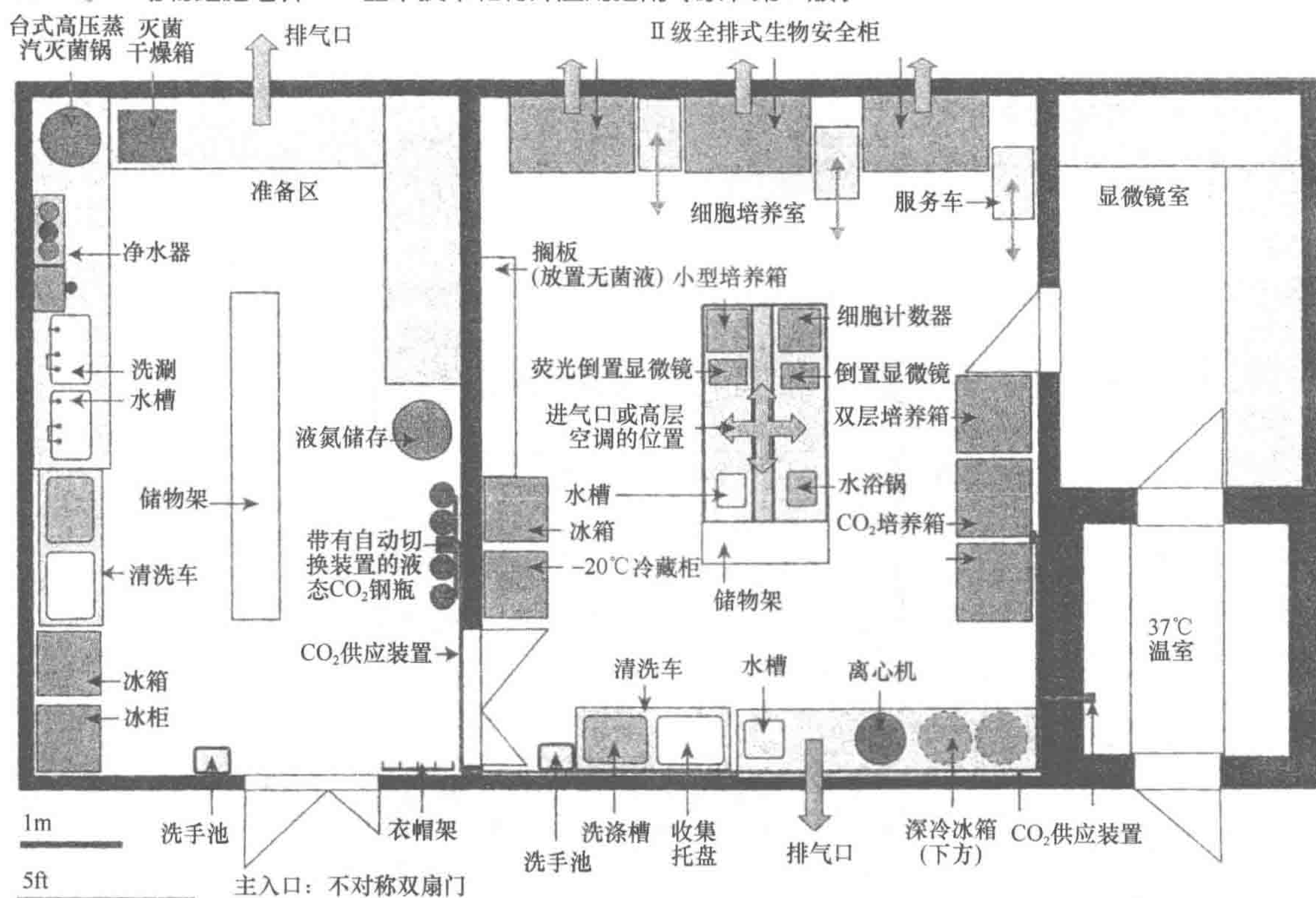


图 3.3 带有相邻准备室的组织培养实验室。中型组织培养实验室（图 3.2），但带有准备区、显微镜室和 37℃温室。1ft=0.3048m。比例尺 1∶100

很有必要建立一个带有相邻准备区的专用组织培养实验室或带有一个公共准备区的多个规模稍小的专用组织培养实验室，这样就不必在只有一个生物安全柜的常规实验室进行组织培养，隔离设施能提供更好的防范保护作用，能将组织培养物与常规实验室中的试剂、玻璃器皿分隔开来，如果涉及人或其他灵长类细胞的培养，则必须采取防范措施（参见 6.8.1 节）。

若有可能，最好将准备区、洗涮区和无菌区与组织培养实验室分隔开，但要彼此相邻（图 3.3，图 3.4）。若你有一个带有单独洗涤和消毒区域的大型实验室，将组织培养室安排在同一层、靠近洁净室的位置，二者之间无台阶阻碍，这样就很方便手推车和小车的使用。最理想的是中间横穿一个走廊（图 3.4，见 4.4 节）。试着想象一下川流不息的交通流（包括人员、试剂、推车等），因此需合理安排布局以尽可能降低冲突，使组织培养室离储藏室近一些，方便物品的取放，同时设置一个方便的通道在不干扰消毒工作的同时补充库存，另外还要方便移除被污染的物品。

如果考虑对现有设施进行改造，很明显会有结构上的局限性；要慎重选择实验室位置，避免空间紧张，同时避免笨重的物体进入房间而导致操作灵活性及空气流动受限。

3.1.1 必备条件

不论规模大小，一个组织培养室必须提供以下设备或条件。

（1）无菌操作区（生物安全柜）。

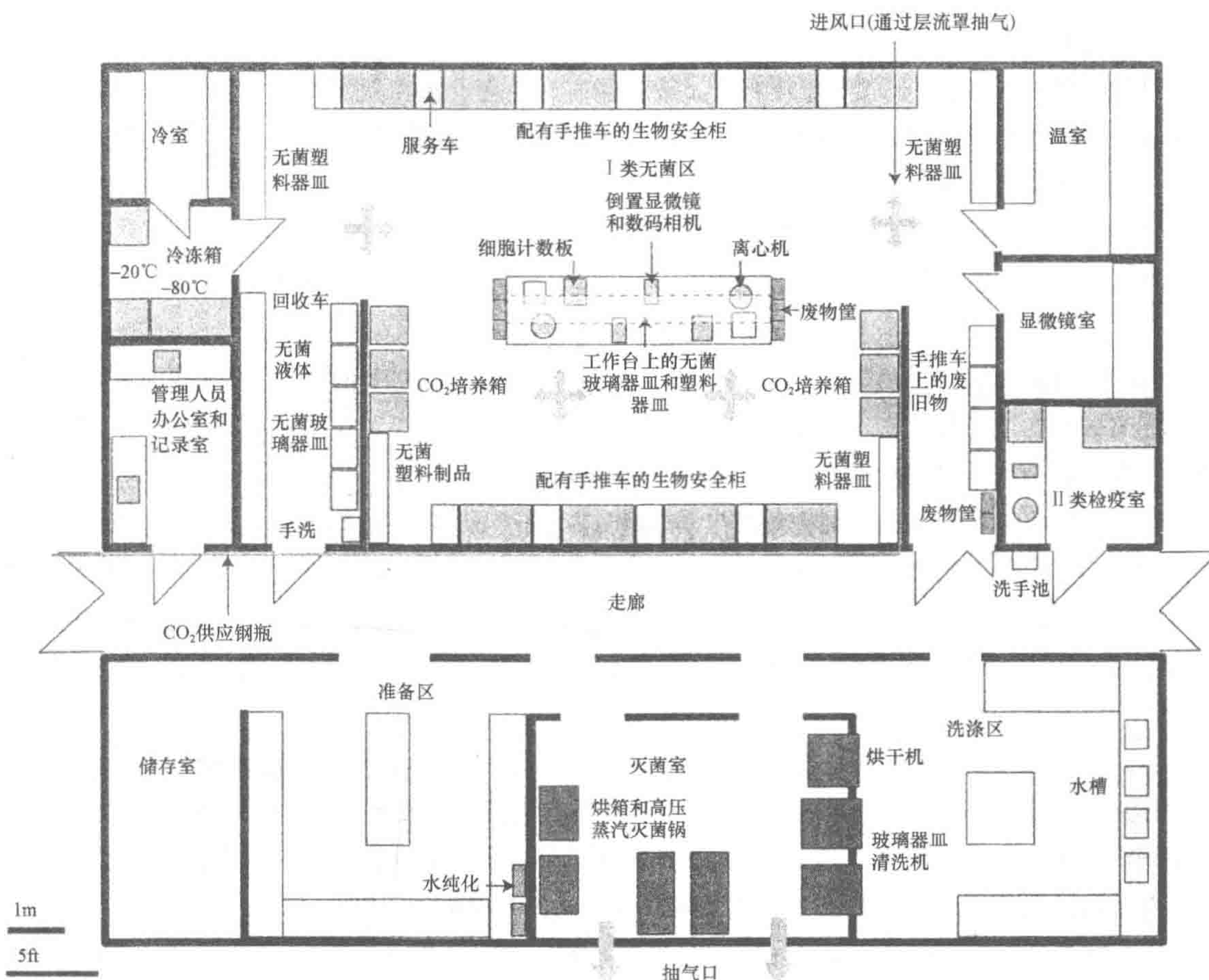


图 3.4　大型组织培养实验室。容纳 20~30 人。具有相邻的洗涤-灭菌-准备区。深色区代表可移动设备；浅色区代表固定的或可移动的器具。1ft=0.3048m。比例尺 1∶200

（2）手推车，为无菌操作区提供服务。

（3）真空泵和储罐，用于抽吸和丢弃细胞培养废液。

（4）防范措施（潜在的生物危害性，隔离）。

（5）潜在生物危险的废物处理（液体、塑料制品、尖锐物品）。

（6）常规废物的处理（塑料包装、纸巾、药签、棉纸）。

（7）洗手（实验室出口处的水槽）。

（8）培养（密封的培养瓶、带气孔的培养瓶、培养皿、培养板）。

（9）大规模培养（生物反应器、滚瓶）。

（10）提供 CO_2（需要纯的 CO_2，与空气混合后向培养物提供气体）。

（11）细胞计数。

（12）离心。

（13）洗涤（玻璃器皿、仪器）。

（14）水纯化（去离子水或反渗水用于漂洗工作，超纯化水用于试剂和培养基的制备）。

（15）准备（液体的制备和装瓶，包装塑料物品的准备）。

（16）消毒（干热、蒸汽和过滤消毒）。

（17）室温下无菌存放（如塑料物品、玻璃器皿、手套、水和盐溶液的存放），4℃保存（如工作液和 10×浓缩培养基），–20℃保存（血清、谷氨酰胺、抗生素），–196℃保存（深冷冰箱储存——安瓿瓶被撑在杆上或置于分段式抽屉里）。

（18）液氮储存（支持用液氮深冷低温箱储存）。

（19）倒置显微镜［用于监测培养物，需要用于绿色荧光蛋白（GFP）等报道基因检测的荧光］。

（20）高倍荧光显微镜（用于 DNA 染色法支原体检测、免疫荧光检测；无须在消毒区）。

有关这些区域的设计在本章第 3.2 节和第 4 章的“必要的设备”一节中有详细论述，但首先必须要考虑影响这些设施规模、设计和布局的各种限制因素。

（1）使用人数。多少人在实验室工作?每人每周工作多长时间?他们培养什么？这些情况决定了生物安全柜配备的数量（还取决于洁净台是否可共用或白天大部分时间是否需要单独使用生物安全柜），是否需要一个大的区域用于操作生物反应器、进行动物组织解剖或大量培养。作一个粗略的估计，一个配有 12 套洁净台的公共实验室可以满足 50 人的间断性需要；长期或连续使用会相应降低其容纳量。

（2）空间。每个设施需要多大的空间？一般来说，最大的空间应分配给培养区以放置生物安全柜、细胞计数器、离心机、培养箱、显微镜、试剂架、培养基、玻璃器皿和塑料制品。可能的话，首先应设一个检疫区（参见 3.2 节）；其次是洗涮、准备和灭菌区域，其占用空间应仅次于培养区；再次是储藏室；最后是温室，这些区域所占空间大小比例为 4∶2∶1∶1。

（3）准备区位置。洗涤和灭菌区应：①位于无菌区附近；②靠近外墙，以便将烘箱和高压蒸汽灭菌锅散发的热量排出。应考虑给负责洗涮、灭菌和准备的工作人员营造一个较好的眺望空间，以减少工作的单调性。科研和技术人员只需盯着生物安全柜工作，不必提供眺望空间。开窗可能带来污染危害，阳光会引起培养基降解使其变质。

（4）储存。工作规模预期有多大？储存一次性塑料制品和其他物品需要多大空间？细胞系的工作量占多大比例？因此需要在相应的液氮中储存。

（5）通道。门道要足够宽、足够高，天花板要预留足够空隙以保证生物安全柜（还需留有额外空间用来安装管道系统）、培养箱和高压蒸汽灭菌锅设备的安装。同时，要留出空间用于维修人员出入进行设备维护。研究人员需要进入动物房获取动物组织吗？若需要，要保证组织培养室距离动物房尽可能近，但要彼此分隔开。在实验室设计上，还要留有一定的空间以便于实验服的二次更换。

（6）防范和灭菌。怎样确保无菌是一个非常棘手的问题，因为防范措施要求组织培养室内的物品不能流入相邻的工作区，而无菌化又要求周围区域的污染物不能进入组织培养室（参见 3.13.3 节）。如果所用的材料具有潜在的生物危害性，但培养工作又必须保证无菌操作，那么这种情况下必须要设缓冲区，如锁气室、准备区、走廊（图 3.5）。

以上这些问题能帮你决定所建的实验室的规模和类型。是建一个只有一个或两个小房间的实验室（图 3.1，图 3.2），还是建配备有洗涮区、消毒区、一个或多个无菌区、一个细胞培养室、一个放置荧光显微镜和光学显微镜的暗室、一个冷冻室和一个储藏间的大型实验室（图 3.3）。如

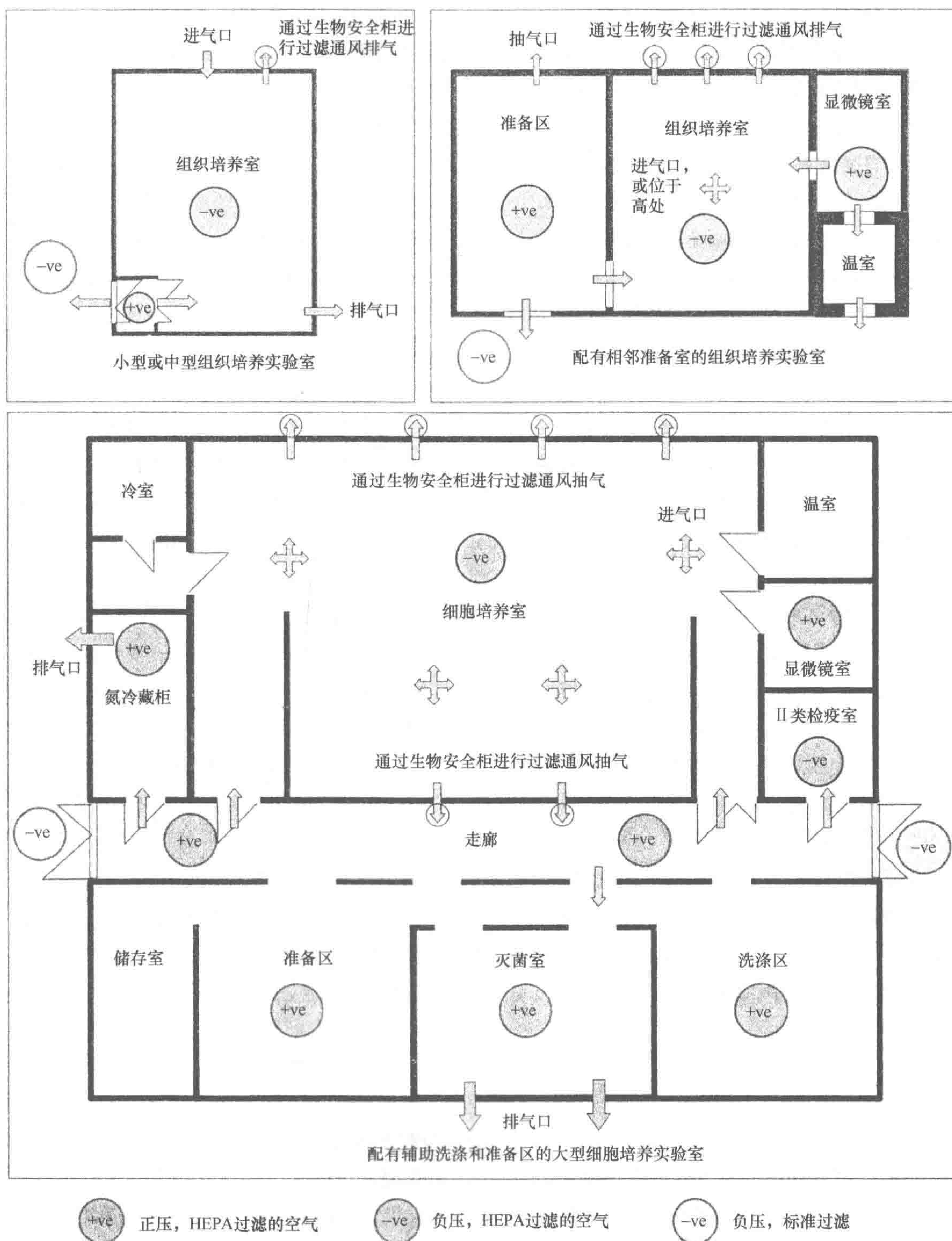


图 3.5 气压平衡装置。标示显示在一无菌实验室内相对压力下不同区域的情况，黑色实心圆圈符号表示 HEPA 过滤空气，浅色圆圈表示常规通风质量

果要求有一个规模较大的设施，最好使洗涤和准备区与组织培养的设施适当分开，并将该套设施放置在实验楼中心或靠近中心的位置。如果洗涤区是一个共用区域，需注意一定要将组织培养玻璃器皿与化学用玻璃器皿分开，同时灭菌物品和非灭菌物品间要有一个明显的区别。使用小型设施很容易确定液氮冷冻柜、液氮罐和 CO_2 钢瓶的位置是在实验室内还是在实验室外，若能将物品存放在一楼专门建造的方便货车进出的储存室，则实验室配置大型设施可能有好处（参见 3.2.7 节）。在需要液氮供应时液氮的运输需要花费一定时间，但无须进料台；而 CO_2 钢瓶的运输相对较快，同时还需要一个进料台以方便将货车上装载的 CO_2 气体通过歧管运输给主要的实验室，为其供应 CO_2 气体，因此这两个区域需要分隔开。单独的两排钢瓶通过自动切换装置相连，从而保证在一排钢瓶中的气体耗完或者更换钢瓶时气体供应不会中断。

3.1.2 服务

需提供的服务包括冷水、热水、动力、CO_2、压缩空气和燃气（民用甲烷、丙烷等）。其中，从安全角度讲，电能比较清洁，并且通常情况下也易于控制。电力方面，常对插座数和每个插座的负荷考虑较少。应仔细估算所需仪器设备，并按三倍于仪器设备的数量和耗电量为实验室供电及配备插座，且靠近电源插座（最好位于电源处），至少主配电盘要能符合这样的要求。也要在准备区（图 3.5）和组织培养区（图 3.1~图 3.4）配备冷水和热水两用的水槽或排水管。应在准备区、洗涮区提供足够的地面排水设施，并且地板水平面从组织培养室到洗涮区应稍有下降。

如果可能，应铺设管道把 CO_2 输送到工作室，并且通气培养所需的混合气瓶等设备需另行配备。对通气培养箱来说，用混合气瓶供气更有安全保障（参见 4.3.2 节）。安装在工作站的气流计或电动气体混合器能够按要求提供合适的混合气体（参见补充材料附录Ⅲ）。对能把纯 CO_2 调节成气体混合物的培养箱来说，一般不再需要使用加压空气了，但如果某一工作站通过混气计或气体混合器提供的是一种气体，那么，使用这种气体时，还需要供给加压空气。在清洗玻璃吸管前，也用加压空气吹掉其中的棉塞。有些玻璃器皿洗涮机（如 Scientek 300）也需要用高压气体。

常常需用真空管吸走培养瓶里的液体。为把瓶里液体顺利吸走，操作者应采取以下几个措施：准备一个收集器，收集器各瓶子的连接管内要装有疏水的滤网，以防止液体、气体或污染物进入真空管和真空泵，通过使用加压打开、减压关闭的脚踏式开关来防止因粗心造成的真空管敞口。为方便起见，要给每个工作台单独配置蠕动泵（参见图 4.1，图 4.9）或在两个工作台之间设置一个抽气泵。

3.1.3 通风装置

为避免外部受污染的空气流入，最理想的方法是相对于外部环境，组织培养室内应为正压状态。然而，如果要求采用防范措施（参见 6.8.1 节），则需要组织培养室内相比周围区域呈负压状态。为满足这两个要求，最好在组织培养室外面，如准备区、显微镜室（图 3.3）或走廊（图 3.5，另见图 3.3 和图 3.4）设一个正压缓冲区，接收组织培养实验室外部的经高效微粒空气过滤器（HEPA）过滤的空气。

最好让生物安全柜的管道口朝外，这样可以促进空气流通和清除实验室的多余热量（每个生

物安全柜的功率为 300~500W)，也便于甲醛污染物的排出；防护罩安在室外，有利于室内空气外流，还可防止由中央空调或室内空调进入的空气与生物安全柜的气流相遇而造成干扰。最好使生物安全柜连续工作，在不使用时要将生物安全柜关闭，一定要打开排风机换气以平衡生物安全柜排出的空气。

3.2　设计与布局

组织培养实验室要具备进行无菌操作、培养、准备、洗涮、灭菌和储存 6 项主要功能（表 3.1)。如果实验室只有一个房间，为使房间不同部位的无菌程度有别，把进行无菌操作的洁净区置于远离房门的一端，洗涮和无菌区位于房间中与洁净区相对的一端，准备、储存和培养区位于两者之间，准备区应靠近洗涮区和灭菌区，储存区和培养区应靠近无菌工作区（图 3.1~图 3.4)。

表 3.1　组织培养的设施

最低要求	理想条件	有用的附加设备
无菌区清净、安静、无过道	空气需过滤（空调）	管道输送 CO_2 和压缩空气
与动物房和微生物实验室隔离	操作台靠近培养室	大型塑料制品放置区
准备区	每个房间要相互隔开	控制区（是检疫区的两倍）
洗涮区（不一定必须在组织培养实验室内，但至少与组织培养实验室毗邻）	配有温度计的温室 隔离无菌室	液氮储存罐（约 500L）及独立的液氮罐存放室
培养箱放置区	钢瓶存放区隔离	显微镜观察室
储存室		暗室
液体储存处（4℃和–20℃)；		真空管道
玻璃器皿和塑料制品放置架；		检疫区
小型物件（抽屉)；		
专用设备（更新慢)，柜橱；		
化学试剂：4℃和–20℃环境（可与液体试剂共放，但化学试剂必须放在有干燥剂的密封容器内）		
CO_2 钢瓶		
液氮罐存放区		
水槽，用于漂洗和洗手		

3.2.1　无菌操作区

无菌工作应于实验室中相对僻静、专做组织培养工作的地方进行，这个地方应没有过道，也没有诸如产生灰尘、气流等因素的干扰，如果没有生物安全柜可用，应设有隔开的房间或小室，最简单的无菌操作区应是顶置的塑料洁净台。为便于观察培养物和进行解剖工作，工作台的颜色以白色或浅灰色为宜。为能准确判别中性红指示的 pH，请不要把东西存放在工作台上。工作台上的架设，如移液架和仪器等都只用于无菌工作（如手持吸管和器械时)。工作台要设置得远离墙壁，也可用塑料板或胶合板将其罩到墙上。

3.2.2 层流柜

能将无菌空气吹到工作面上的层流柜（参见4.2.1节，图4.1和图5.3）与无菌室相比，不仅成本低，而且无菌控制效果更好。生物安全柜往往根据不同用途进行设计，但是绝大多数组织培养实验室会选择Ⅱ级生物安全柜，而且以后该术语将被用于描述这些工作站。尽管一些操作并不要求使用Ⅱ级生物安全柜，但是，在进行有关人类细胞系的实验时，由于后面设备的升级花费更高，产生的破坏性影响更大，因此最好考虑在某些阶段使用生物安全柜，并在最初设计实验时就将生物安全柜的使用考虑进来（参见4.2.1节）。使用带有可锁定转向轮的独立式生物安全柜是首选，因为这种生物安全柜可根据需要移动位置，实现专人专用。

如果几个生物安全柜并排放置，各生物安全柜间的距离不应小于0.5m（约2ft*），从而给维护工作留下空间，同时尽量减少超净台之间的气流干扰。如果两个生物安全柜以正面相对放置，则它们最前沿间的距离不应小于3m（约10ft）。因为生物安全柜会影响通风，所以生物安全柜应该被作为施工合同的一部分进行安装。根据需要选择移动式洁净台或顶式生物安全柜。生物安全柜下面要留有足够放腿和放抽气机、抽吸器（图3.1，图4.1）的空间。移动式生物安全柜应安装有轮子，便于根据需要作位置调整。座椅的高度要合适，座位和后靠背要可调，并且能移动至生物安全柜前沿，便于操作者舒适地工作。在每个生物安全柜旁边配置小推车、台车或升降架［至少0.5m（约18in**）高］，用于放置实验记录本及必需但不立即使用的材料。手推车可以被拉出来用于补进所需物品，也可以用来移除工作区域中废旧的和被污染的物品材料。每次操作员变更时，都要换上一个干净的、放满物品的手推车。

3.2.3 工作台

在离无菌操作区较近的地方应设一个工作台，方便放置细胞计数器、显微镜及其他仪器。这个工作台还有把无菌操作区与实验室的其他部分分开或隔开的作用（图3.1~图3.4）。工作台需要有存放无菌玻璃器皿、塑料制品、吸管、螺旋盖、注射器等物品的功能，如下方橱柜和上方样品架。工作台也应用来放置其他辅助仪器设备，如内容物易于拿取的小型离心机等。

3.2.4 检疫和防范

如果空间允许，有必要指定一个单独的房间作为一个检疫和防范室（CDC 2014）（图3.4），这一单独的无菌室应该用门或气锁与其他区域隔开，且相对其他无菌区呈负压状态，同时要配置专用的生物安全柜、培养箱、冰箱、冷冻箱、离心机、物品材料和处理设备。新引入的细胞系或活体组织材料可在此处理，直到确定不再有支原体感染（参见14.3.2节，方案14.1、方案14.2）和HIV、乙肝病毒等极具危险性的病原体的感染。如果当地实验室法规允许，同一个房间可在不同的指定时间作为二级防范水平的防范室来用。如果防范要求更高的话，还需要一个专用的生物安全柜用于分离提取物和病原体成分（参见6.8.2节）。

---

* ft，英尺，1ft=0.3048m。

** in，英寸，1in=0.0254m。

3.2.5 培养

培养工作所要求的洁净条件没有无菌操作严格，但清洁的空气、较少的干扰和尽可能少的人、物过往有利于避免灰尘、孢子及其他污染物进入培养区。进行何种培养往往取决于其培养规模、温度、气相成分及与工作间的接近程度。普通的培养箱或温室就可满足需要，也可能用到温湿度CO_2培养箱。一般来说，大量的培养瓶或者密封好的大容量培养瓶最好在温室中孵育，而敞口培养板则必须在温湿度CO_2培养箱中进行孵育。

培养箱 培养工作可在培养箱中进行，也可在控温温室中进行（图3.6）。如果一个或两个培养箱就能满足需要，那么，用培养箱相对便宜、经济，而且节省空间；这些培养箱（Cellon）可现场组装或解组装，不需要时就可以搬走。如果需3个或4个以上的培养箱，用培养箱就比用简单的温室代价高，也没有温室用起来方便。打开培养箱时，热量散失较多，温度恢复也比温室慢。粗略地说，每人需要占有0.2m^3（200L，约1.6ft^3）培养空间和0.5m^2（约6ft^2）培养架面积。另外，还需要设置一到多个湿CO_2培养箱（参见4.3.2节）。

温室 如果实验室内有可利用的空间，或者有一相邻房间，或者有一个使用便捷的大橱柜，可以把它们改造成温室（图3.6），温室区无须专门设计和建造，但温室应隔热，以防在墙上产生冷区。隔热的方法是在离墙约5cm（约2in）处装上塑料层流护板，中间填满玻璃纤维、石棉或防火泡沫塑料等，并用内衬有杂色布条的铁皮条或大头针固定挂墙层板，这样便于清楚锚定位置。护板支架间距500~600mm（约21in），以能支撑护板而不向下倾斜为宜。采用组合式培养架更好，便于清洁房间时将它们移开，培养架之间要留出200~300mm（约9in）距离，培养架下部用450mm（约18in）的宽搁板，人的水平视线以上部分用250~300mm（约12in）的窄搁板。用带孔搁板组装成的培养架有利于空气流通，搁板必须光滑、无凹凸不平。

要考虑使用寿命周期内温室的空间大小。建造一个较大温室比建造一个小型温室的费用多不了多少。根据需要培养架的多少计算温室的造价，若建设工作刚开始，整个温室的投入需按培养架总费用的5~10倍计算；若建设工作已经进行了一段时间，整个温室的投入应按培养架总费用的2~4倍计算。

尽量避免选用木质陈设，因为木材受热后易弯曲，污染物也易藏匿其中。应该在温室的某一位置配置一个小工作台，工作台最好用不锈钢或层压塑料板制成。工作台上可容纳待检培养瓶、一台倒置显微镜和一个笔记本。如果打算做细胞同步化实验或需要在37℃条件下进行无菌操作，那么，应该在工作台的操作人员对面墙上或在工作台上面安装一个大小为300mm×300mm或450mm×450mm（12~18in）的层流过滤装置，或直接在温室内安装一台不超过1000mm（约3ft）宽的洁净台。运风电机应是为高温条件下的工作专门设计，不能连续运转。如果连续运转，电机就会因过热而被烧坏。

一旦有了温室，有些人就想用它做一些非组织培养的工作，所以工作台应设计得大一些，便于进行试管孵育、摇床培养等。但绝不允许进行有关细菌、酵母菌等微生物的培养。

照明最好用白炽灯，不用荧光灯，因为荧光灯会使培养基成分破坏，而且有的荧光灯很难照亮温室。然而，白炽灯照明正在被逐步淘汰，取而代之的是寿命长、输出更多紫外线的节能荧光

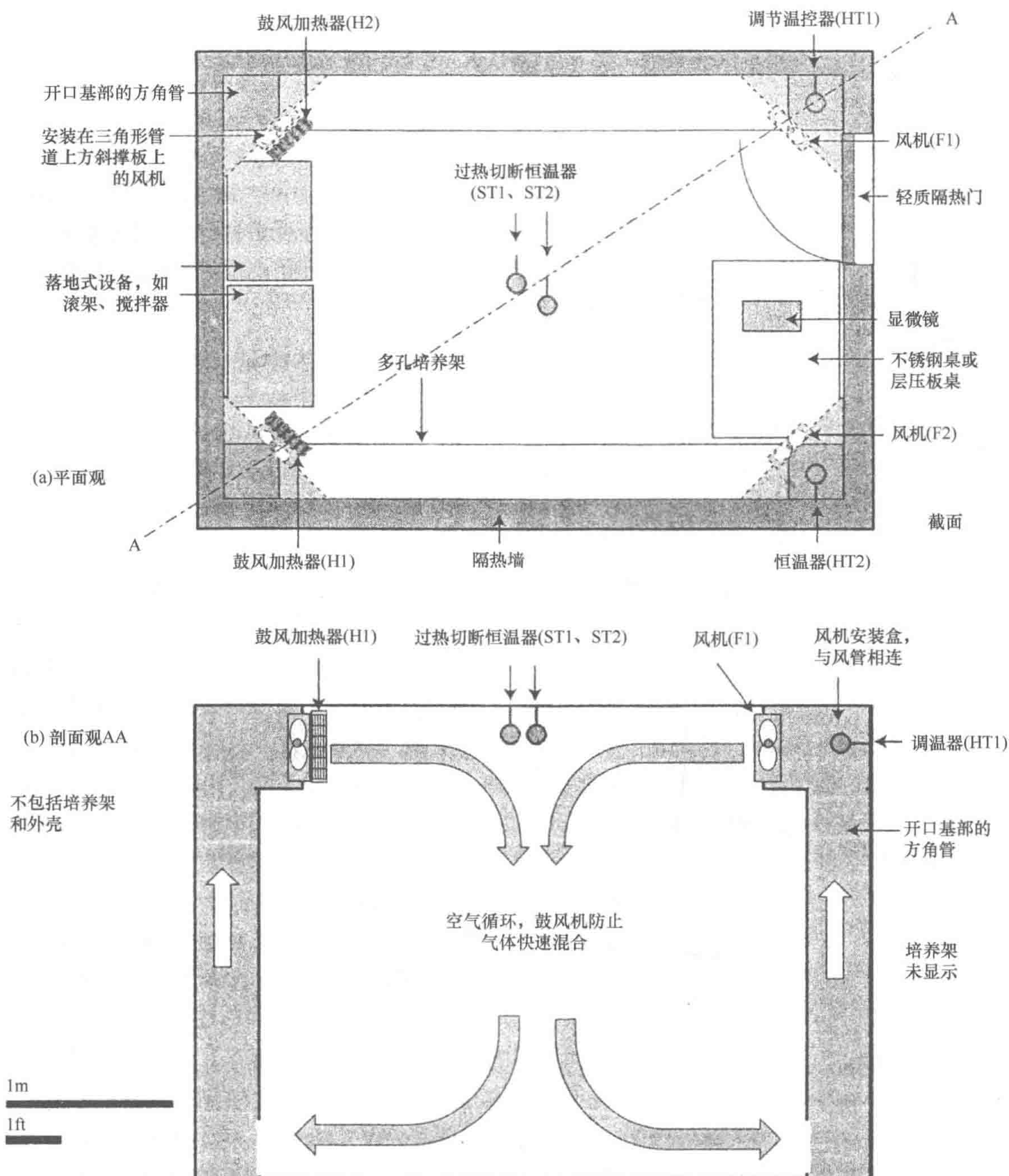


图 3.6 温室。双重加热循环和安全温度计。(a) 平面观；(b) 对角线部分。箭头代表空气流动方向，布置和设计由包斯威尔的 Malcolm McLean 和肯尼思 Munro 协会的 Mitchell 和 Johnson（建筑师）及 Jimmy Lindsa（顾问工程师）合作完成。比例尺 1∶50

灯（Khazova and O'Hagan，2008）。可通过使用双层灯降低灯光带来的危险，但培养基最好不要放在离此光源太近的地方。

在任何时间和任何地点，温室温度都要控制在±0.5℃的变化范围内，这与控温装置的灵敏度、精确度、恒温器控温元件的位置、房间的空气循环、绝缘材料的质量、房间其他设备（搅拌器等）

的散热等诸多因素有关。

下面列出的是一些与温室相关的其他事项。

空气循环。在温室与鼓风加热器相对的一角装上一台辅助鼓风机，其鼓风方向与鼓风加热器的风向相反，以保证最大限度的空气对流，若房间面积大于 2m×2m（6ft×6ft），采用适当的管道通风是必要的。对正方形温室来说，封锁拐角（图 3.6a）是最简单和最经济的方式；若温室是长方形，可在温室两端建一个伪墙，但伪墙不能与温室的其他结构相连，而且一定要坚固，能够支撑搁板。

恒温器。恒温器是一类比例控制器，可按室温与设定温度间的差异的一定比例控制热量的补停，这样，当开门造成室温降低时，通过马上加热使室温迅速回升。同时，也保证了温度不超过温控线，因为设备处温度越接近温控线，提供的热量越少。

加热器。最好根据温室大小选择家用或工业用鼓风加热器提供热量，根据隔热情况，大概每 20m^3（700ft^3）需要 2~3kW（用两个加热器，每个加热器产生 1~1.5kW），加热器上的风扇应能连续运转，加热元件的功率应能得到有效调控。最理想的办法是分别安装两个独立的加热器（H1 和 H2），每个加热器有自己的恒温器（HT1 和 HT2），恒温器（HT1）应放置在加热器（H1）对角的辅助鼓风机（F1）后面，设置的临界温度为 37℃。另一个恒温器（HT2）应放置在加热器（H2）对角的辅助鼓风机（F2）后面，设置的临界温度为 36℃（图 3.6a）。应安装两个过热切断恒温器（ST1 和 ST2），一个与 HT1 串联，设置的温度为 38℃，另一个与两个加热器的主电源串联，若第一个加热器的温度超过了设定温度，ST1 将断开，这时第二个加热器（H2）接着工作，调节 HT2 的温度，若第二个加热器温度过高，ST2 将切断所有加热器的电源（表 3.2）。还要安装两个报警灯，以指示 ST1 和 ST2 的状态。为达到最大灵敏度，恒温器的感温元件应安装在气流较强区域，靠近辅助循环鼓风机的出风口处。由于高导热感温器（热敏电阻或热电偶）比压力球式感温器反应灵敏，应优先选择。

表 3.2 温室恒温器

恒温器	37℃	<37℃	<<37℃	>37℃，<38℃	>38℃	>39℃
HT1	○	｜	｜	○	○	○
ST1	｜	｜	｜	｜	○	○
HT2	○	○	｜	○	○	○
ST2	｜	｜	｜	｜	｜	○
报警灯 ST1					◆	◆
报警灯 ST2						◆

注：“｜”表示开；“○”表示关；“◆”表示指示灯亮；HT1 为调节第一个加热器（H1）的恒温器；HT2 为调节第二个加热器（H2）的恒温器；ST1 为第一个加热器（H1）的上限切断安全恒温器；ST2 为第一个（H1）和第二个（H2）加热器共用的上限切断安全恒温器

过热。人们多把注意力集中在供热和快速补充热耗方面，而常忽视产生的多余热源。以下原因导致多余热量产生：①天气炎热时，实验室环境温度升高；②温室内的仪器设备，如搅拌器电机、滚筒运转、层流装置等运行时产出的热量。解决的办法包括尽量不把产热设备放到温室内；使用比机械磁力搅拌器产热少的感应式磁力驱动搅拌器；需经常把滚筒架的驱动电机搁放在室外散热。在热带地区，过热是常遇到的问题，解决办法是在加热器的管道通风处加一个冷却盘管。

入口。如果调控器性能好，空气循环畅通、热源功率合适，则不需安装风帘。但门仍需用泡沫塑料或玻璃棉隔热，质轻、容易关闭，最好能自动关闭。很有必要设一个通向组织培养区的窗口，把培养架安置在窗口两侧，这样很容易将培养物转至温室，窗口也应装带有隔热芯的双层门。若把窗口装在工作台上面，可避免在培养架上产生冷点区的危险。

温度计。应在温室内安装温度记录仪和记录纸，以便工作人员随时了解室内温度变化情况。记录纸要每周更换。另外，如果条件许可，还应在记录纸的两边或温室其他容易看到的地方装两个报警灯，一个指示温度超过设定温度，另一个指示温度低于设定温度。

3.2.6 准备区

培养基配制 如果培养基的市场供应源可靠，小实验室就不必自备培养基了。但对一个大型实验室（约有50人从事组织培养工作）来说，用自备培养基更经济划算。相对较小的实验室最好购买制备好的培养基。对那些购买现成培养基的小型实验室来说，只需准备试剂如盐溶液和乙二胺四乙酸（EDTA），分装溶液和水，包装螺旋盖或其他小件无菌用品。在所用物品都是无菌、不再需无菌处理的情况下，仍需保持准备区清洁和安静。

如果很难买到来源可靠的商品化培养基，就需要自行制备，那么准备区就得大到可以容纳粗天平、精密天平、pH 计等仪器，如有可能，还需准备一个渗透压计。工作台空间大小要满足溶解、搅拌、分装溶液和各种物品的包装等活动。另外，工作台周围要有一定的空间和放置冷藏货架的空间。如果有可能，应在无菌区单独安装水平层流型生物安全柜，用于无菌过滤和分装无菌溶液。注意，由于具有吸入粉尘和悬浮颗粒的潜在危险，抗生素和有毒试剂不应在水平生物安全柜中处理。同时，要在培养箱内留出一定空间用于无菌质控（如检查培养基有无污染、无菌操作是否严密等）。

热稳定溶液和设备的高压蒸汽消毒或干热灭菌工作在准备区未经消毒的一端进行，然后把灭过菌的物品集中存放到储存区（图3.3）。

洗涤 如果使用的是一次性塑料器皿，可以避免大量的洗涤工作，但玻璃器皿和使用过的塑料器皿的处理仍需要借助洗涤，当然也需要借助高压蒸汽灭菌处理。最好把洗涤和消毒的设备放到组织培养室外面，因为快速的气流有助于消散这些设备产生的湿气和热量。如果可能，应把高压蒸汽灭菌锅、烤箱、蒸馏器单独放到一个安装有高效抽风机的房间内（图3.3，图3.4）。洗涤区要留一定空间用来浸泡玻璃器皿和放置自动洗涤机，还应该有足够大的台面用来放置玻璃器皿、分拣移液管及包装要进行灭菌的物品。如果使用玻璃移液管，还需留一个放置移液管洗涤器的空间。如果灭菌设备必须放到无菌室内，应把它们放到离无菌区排气口最近、离无菌操作区最远的地方。

如果刚准备筹建实验室，水槽的大小尺寸可按需要设计，用不锈钢或聚丙烯材料最好，前者适于涉及放射性同位素的工作，后者适于使用次氯酸消毒剂。

水槽要足够深（450mm，约18in）以使人工洗涮时漂洗液能直接淹没最大的待洗物品。从地板到水槽底的距离为900mm（约3ft）（图3.7），水槽高了比低了好，因为对低个子使用高水槽来说，脚下垫个台子就行了，而对高个子使用低水槽来说，得一直弯腰工作，很累。水龙头后面的水槽面外沿和水槽上沿内侧四周应凸出来，以防止溢水和弄湿洗涮人员的衣服。

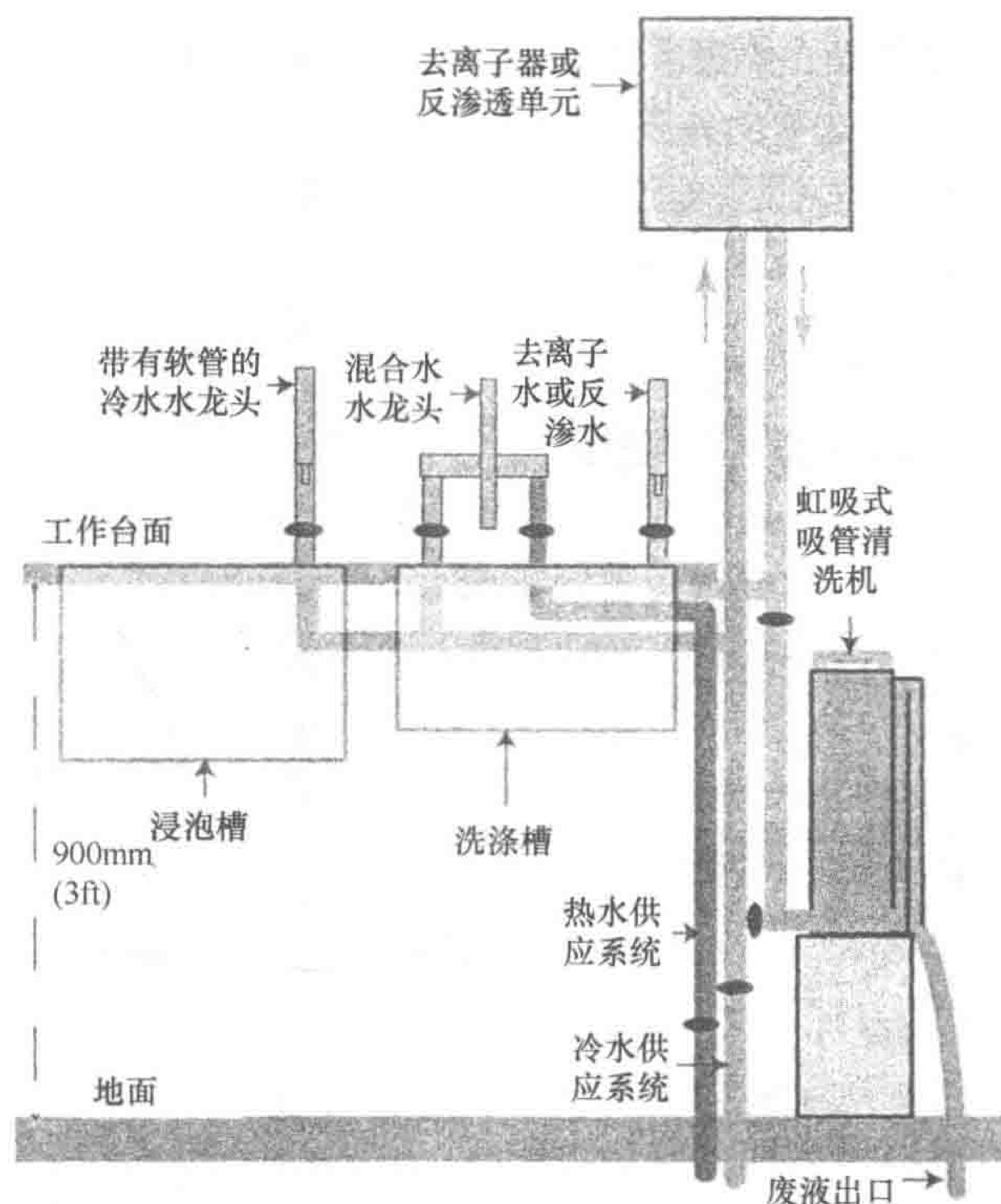


图 3.7 洗涮水槽和吸管冲洗器。浸泡槽和清洗槽的设计，上设有供应冷水、热水和去离子水的装置。比例尺 1∶16

每个水槽上应安装 4 个水龙头，一个出冷水，一个出冷-热混合水，一个是通过软管与冲洗装置相连的冷水水龙头，一个是与水槽上方去离子水储池相连的用非金属或不锈钢制成的水龙头（图 3.7）。应该避免集中供应去离子水，因为管道内会有尘垢和藻类，很难清洗。

在收集脏玻璃器皿和发放新无菌用品时，手推车通常很有用，但记住给它们安排停放的地方。

3.2.7 储存

下列物品必须有一定的储存量，切记无菌物品和非无菌物品要分开放置并标记清楚。

（1）无菌液体（盐溶液、水等）储存在室温；培养基储存在 4℃；血清、胰蛋白酶、谷氨酰胺等储存在–20℃或–70℃。

（2）灭菌的和未经消毒的玻璃器皿，包括培养瓶和吸管等。

（3）一次性无菌塑料器皿（如培养瓶、多孔板、培养皿、离心管、小玻璃瓶和注射器等）。

（4）灭菌的和未经消毒的螺旋盖、瓶塞等。

（5）灭菌的和未经消毒的各种装置，如滤器。

（6）手套、塑料袋或其他一次性物品。

（7）用于补充液氮罐中损失的液氮。液氮可通过以下 3 种方法储存。

（a）储存在工作台下方的杜瓦瓶内（25~50L）。

（b）储存在推车上的一个大液氮容器中（100~150L）。

（c）储存在一个液氮储存罐中（500~1000L）。要有液氮储存罐的专用房子，房子要通风良好、防风防雨、安装有安全的外开门（图 3.8）。

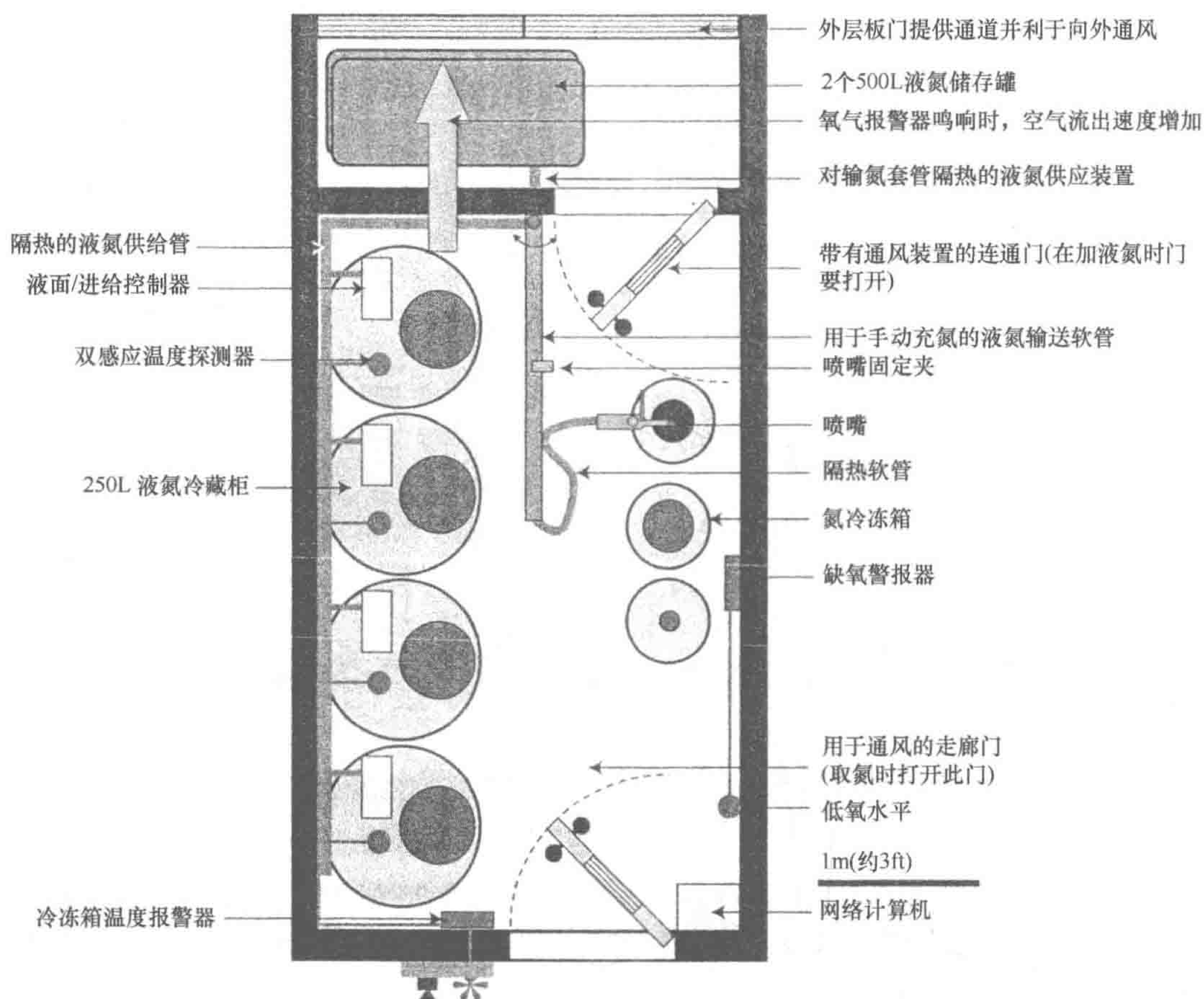


图 3.8 液氮储存和冷冻储存。最好将液氮储存室建在实验室的墙外，便于向外通风和运输液氮，如果冷藏库就在隔壁，则可以直接通过架设的管道为冷藏库充加液氮。加液氮期间，门要打开便于通风。如果氧浓度低于安全线，装在墙上的缺氧警报器报警

如果选用的是方法（c），那么就能很方便地将液氮冷藏库紧挨液氮储存罐放置。液氮冷藏库与液氮储存罐相连，向其稳定供应液氮，同时每个液氮冷藏库都能自动控制液氮流量。对于普通的冷藏库来说，液氮只能存放在其中的冷冻储藏室内，调节器通过检测上、下限水平来开启或启动灌装过程。建议在与报警器相连的开关探头下方另加一个探测器，以便在冷藏库无法进行液氮灌装时发出报警信号。此外，还应该在设定温度为–160℃储藏室的顶端附近和中央设置一个双温传感报警器，并相应地在室外安装一个报警灯和报警器（参见 3.3 节）。

液氮冷藏库有可能发生储藏室中液氮的污染，应把它们放在清洁的地方。使用非恒温箱（一种墙体灌注式液氮冷藏库，液氮在冷库储存区域内不会散团）将有助于防止污染发生（参见 15.3.6 节）。

▲安全提示 储存和分配液氮的房间一定要通风良好，最好在靠近地板处安装一个报警器，

在氧分压降到安全标准以下时能及时报警。安全检查的原因是分配和补加液氮及取冻存材料时，往往伴有液氮的气化（1L 液态氮≈700L 气态氮），气化的液氮会取代房间的空气。当氧含量降低至 20%以下时会触发报警，通风量会自动增加。例如，如果正常的空气换风量为 10 次/h，这时的换气次数就增加为 15~20 次/h。当警报响起时，通风增加直到氧气水平恢复正常时才能允许人员进入该房间。

（8）按要求用独立式气缸储存 CO_2，并将其转运至实验室。

▲安全提示　要用铁链把气缸固定到墙上或绑到搁板架上（参见图 6.3）。

（9）可以通过管道把 CO_2 输送到工作区，也可用定期灌充的 CO_2 加压罐（要用运载工具）把 CO_2 按时送到工作区。到底用什么方法获得 CO_2 合适，要根据使用量和成本来定，一般来说，2~3 人时，选用钢瓶供 CO_2 最好；10~15 人时，用钢罐管辖供 CO_2 合适；超过 15 人时，建议准备一个储存罐。

储存区 1~6 应位于易到达无菌工作区的位置内，冰箱和冷冻箱应置于实验室靠近非无菌区一端，因为门和压缩鼓风机会产生灰尘和气流，并能带进真菌孢子。还有，定期给冰箱和冷冻箱除霜时，会产生一定程度的污染，故冰箱和冷冻箱最好与无菌工作区分开。

设计储存区的关键是考虑存取物品的方便性，双侧型储存室很适用，可以做到一侧进货、一侧供货。

▲安全提示　如果物品架很高，并且有玻璃器皿和试剂放于其上，则有必要在物品架两侧搁板上部安装挡板，以防止在取放物品时意外地把物品挤下。

切记要为储存区多留些位置，以便进行批量采购，这样做既省钱又可减少多次运输的风险。大体上，每人需 200L（约为 8ft^3）的 4℃冷藏空间和 100L（约为 4ft^3）的–20℃冷冻空间。人少时，可适当增加每人的使用空间，这样的话，每人可占有 250L（10ft^3）的冷藏空间和 150L（6ft^3）的冷冻空间。当然，这些数字指的是储存空间，还要另外留出进入大冷藏室和冷冻室的通道及工作空间。

一般来说，分隔式的–20℃冷冻箱要比进入式的冷冻室好些，它们易于清洁和维持低温；且当某一台冷冻箱出现故障时，找替代冷冻箱也比较容易。毋庸置疑，冷冻室也有一些优点：冷冻室每立方米可提供较大空间，但最需要考虑的是，清洁和除霜是否容易和准备分配给每个工作人员多大空间。虽然分隔式冷冻箱比同样体积的冷冻室占用的空间多，但在出现故障时，前者易于管理和维修。同时，应考虑到留出额外的冰箱和冷冻箱空间，以满足日常维护的需要和应对突发故障。

3.3　灾害管理

许多设备及受限或防范区需要安装设置一个在温度或通风控制发生故障时发出报警声的报

警器。一些故障并不严重，只需常规维修即可，但像培养箱发生故障，或液氮冷藏库、–80℃冷库温度升高等状况若不及时处理，就会造成毁灭性后果。明智的做法是设置一个集中报警控制板，放置在实验楼入口通道或者其他公共区域等比较显眼的地方，它们就像火灾报警系统一样，能够显示严重报警的时间及发生的位置，而且可以使包括安全巡逻员在内的进入实验楼的每个人都能看得见。如果在控制板旁（以及关键设备的报警器上）张贴联系电话，那么就能很快联系上相关责任人。也可以将报警器与电话系统相连，这样当某一个关键设备发生故障时则会向指定人自动发送警报。

正确的执行程序和联系人姓名应张贴在报警控制板旁边，并要引起所有人员的注意，如新来的人员一到就要加以引导。一定要让他明白参与的必要性，因为这对每个人都有好处。他最初的反应往往有点恼火，但须知事关所有人，每个人都应知晓。

这些预防措施会避免实验室内个别危险的出现，但是大灾难发生的可能性也应该考虑到，如停电、大火、地震和洪水等。安装一台备用发电机可防止第一种情况发生。由于电力需求量太高，不可能将所有的设备、服务设施及照明设施连接到发电机上；但是可以安装一个备用电路与关键设备相连。如果主电源发生故障超过一段时间，这条备用电路可通过与常规电源相连或备用发电机相连进行供电，根据停电发生的频率和持续时间，供电时间可持续数秒或数分钟。

应对其他大灾难的应急方案或许必须接受牺牲设施和设备这一后果，但是丢失一些储存的资源，如–80℃冷藏库中的液氮量，则关系不大。像这些不可替代的存货或材料应该在另一个实验室或储存设备里有异地备份。例如，在可能出现广泛的微生物感染或交叉感染等危险的地方，细胞系应该存放在一个值得信赖的细胞库中，如果有必要，可明确规定为了安全存放不允许随意放置。同样，那些常规性在本实验室备份的有价值的细胞系资料也应改为经常性在其他实验室储存备份，或者储存在具有该类服务功能的互联网服务器托管的云端。

参考文献

CDC (www.cdc.gov/biosafety/; www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm; www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_appendixA.pdf).

CDC (2014). Primary containment for biohazards: Selection, installation, and use of biosafety cabinets(http://www.cdc.gov/biosafety/publications/index.htm).

HSE(www.hse.gov.uk/).

Khazova M, O'Hagan JB (2008). Optical radiation emissions from compact fluorescent lamps. *Radiat. Protect. Dosim.* **131**:521–525.

NIH:*Health &safety guidelines for grantees &contractors*(http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/not95-209.html).

OGTR (Office of Gene Technology Regulator(www.ogtr.gov.au/).

OSHA (www.osha-occupational-health-and-safety.com/toc1d.htm).

（徐存拴　译）

第4章

设备和材料

4.1 组织培养实验室的要求

除非没有经费限制，否则必须优先考虑一个组织培养实验室的特定需求。

（1）必需设备，没有这种设备就不能稳定开展组织培养工作。

（2）有利设备，有了这些设备，工作可以做得更快、更好、更有成效，还可以降低工作强度。

（3）常用设备，这些设备可以改善工作条件，使实验室工作更为轻松方便，减少疲劳，做更精细的分析，让工作环境更有吸引力（表4.1）。在本章以下小节中，各种设备在基于活动的标题词下面被一一描述，在表4.1中给出了它们的优先级别。

补充材料中的附录Ⅲ列出了各个设备的来源及供应商的详细资料。

表4.1 组织培养设备

项目	目的
必需设备	
生物安全柜	保持无菌环境，防范潜在的生物危害
培养箱	控制培养温度
湿式CO_2培养箱	控制湿度及CO_2浓度，针对开放的培养板或培养皿
液态CO_2钢瓶，无虹吸管	用于CO_2培养箱（除非管道供应CO_2）
CO_2钢瓶自动转换装置	在第一个钢瓶的CO_2用完时作备用
5% CO_2钢瓶	用于向培养瓶供应气体（除非管道供应CO_2和空气）
倒置显微镜	观测培养物
台式离心机	离心细胞以除去胰酶、保护剂或实验性添加剂
血细胞计数板	细胞计数
移液器	小体积分装（5μL~1mL），准确、可反复
洗耳球	控制移液管的吸液和分液
冰箱	培养基和试剂的局部存放
冰柜	性质不稳定的培养基、试剂及血清的–20℃存放
液氮冷冻箱	菌种保护和细胞系储存
液氮杜瓦瓶	为冷冻箱局部供应液氮（除非附近有液氮供应系统）
细胞冷冻的缓慢冷却装置（参见15.3.4节）	控制细胞的冷冻速度
蒸馏或水净化器	提供超纯水

续表

项目	目的
必需设备	
天平	称量化学物质以制备试剂或培养基
浸泡缸或水槽	收集器皿进行洗涤
深洗槽	洗涤玻璃器皿
移液管筒	收集并消毒使用过的移液管
吸管清洗器	洗涤玻璃吸管（除非用一次性吸管）
蒸汽灭菌器（高压蒸汽灭菌锅）	用于稳定液体或固体的灭菌
高、低温干燥烘箱	干燥玻璃器皿和塑料器皿
灭菌烘箱、高压蒸汽灭菌锅及温室中的温度记录仪	监视培养箱和灭菌器的工作状态
有利设备	
蠕动泵	除去培养瓶中的液体；过滤除菌
细胞计数器	自动细胞计数
倒置显微镜相机	记录细胞图像、与参照物对比
活细胞成像装置	监测活细胞的生长曲线及细胞应答
台车或手推车	物品在生物安全柜上临时存放
移液控制器	控制移液器的抽吸及分液（可代替洗耳球）
编程控制速度的冷却器	用于细胞冷冻
磁力搅拌器	维持细胞的悬浮培养或原代培养细胞的胰酶消化
便携式温度记录仪	用于检测温室或培养箱的温度
玻璃器皿清洗机	洗涤玻璃器皿和吸管
吸管干燥器	干燥玻璃吸管
吸管塞	堵塞玻璃吸管
台车或手推车	将废旧玻璃器皿从细胞培养区转移至洗涤区
塑料切碎器/灭菌器	塑料器皿的处理或循环使用
pH 计	检测制备的培养基和试剂的 pH（如无酚红试纸可用）
电导仪	试剂的质量检测
渗透压计	试剂的质量检测
自动分液器	液体分配，如用于细胞计数器
大型冰箱或橱柜式冷冻间	培养基和试剂的大批量长期保存
灭菌烘箱	玻璃、金属及耐热塑料器皿的消毒；是干燥烘箱的两倍
过滤灭菌器	热稳定性液体的灭菌
聚乙烯袋封口机	包装用于长期保存的无菌物品
相差正置显微镜	细胞的高倍镜观察
荧光显微镜	观察用荧光抗体（用于荧光标记）、DAPI 或 Hoechst 33285（用于支原体检测）等荧光素标记的培养细胞
计算机	冷冻箱记录和细胞系基本数据处理
低温冷冻箱（≤-80℃）	储存不稳定性试剂；隔热容器中冷冻管的冷藏
特殊用途的设备	
大容量离心机（6×1L）	收集大规模悬浮培养物
微量滴定板读取器	微量滴定检测中显色终末分析
旋转架	扩大转瓶培养
旋转壁式生物反应器	扩大 3D-培养

续表

项目	目的
特殊用途的设备	
CCD照相机和定时视频装置	实时、定时播放
菌落计数器	接种效率和存活率检测的克隆计数
细胞大小测量器（如Casy、Coulter、Guava）	检测细胞体积大小
共聚焦显微镜	较厚样品的荧光分析；Z-区分析
荧光激活细胞分选仪	细胞分选/分离；不同标准的细胞群分析
显微操作仪	显微操作
微量滴定板、闪烁计数器	微量滴定板中的放射性检测
离心淘洗器、离心机和转子	大规模细胞分离

4.2 无菌工作区

4.2.1 层流生物安全柜

如果有通行受限、适当隔离的清洁房间，那么无菌工作无须借助层流就可以进行。然而，大多数实验室通常繁忙而拥挤，很显然，提供无菌环境最简便的方法是使用层流生物安全柜（BSC）。通常，一个生物安全柜足够2~3人使用（参见5.4节）。层流生物安全柜比较便宜，同时还能为培养物提供最好的无菌保护，但实际上，层流生物安全柜仅适于培养基（不含抗生素）和其他无毒无菌试剂的制备，以及非灵长类动物细胞的培养，尤其适合解剖非灵长类动物组织进行原代培养。对有潜在危险的材料（包括人类在内的所有灵长类细胞系、产病毒的培养细胞、放射性同位素、致癌或毒性药物）来说，应该在Ⅱ级（图4.1，表4.2）或Ⅲ级（图7.4）生物安全柜中进行处理。实际上，现在大多数实验室将Ⅱ级生物安全柜作为使用标准。本章后面有关生物安全柜的相关参考信息均指Ⅱ级生物安全柜，除非有特别说明。Ⅱ-A级生物安全柜内70%气体通过进气过滤器过滤循环使用，30%气体经排气过滤器排放到环境中或经由普通室内通风管道排到室外。Ⅱ-B1级生物安全柜内气体中40%可再循环使用，其余60%气体排出；而Ⅱ-B2级安全柜内气体（100%）经专用排气管道全部排出。

▲安全提示 由于各地法律要求和规定不同，因此在安装设备之前，熟悉当地和国家的生物危害规定是十分重要的（参见6.8.1节）。

在购买和安装一台新生物安全柜之前，需要考虑以下的检查清单。

（1）尺寸。除非有特殊的大设备在生物安全柜内使用，通常，1200mm（4ft）长×600mm（2ft）宽的工作台面就足够用了。

（2）安装。确保生物安全柜能搬进组织培养实验室。保证有足够的净空高度利于向房间通风或导向室外。

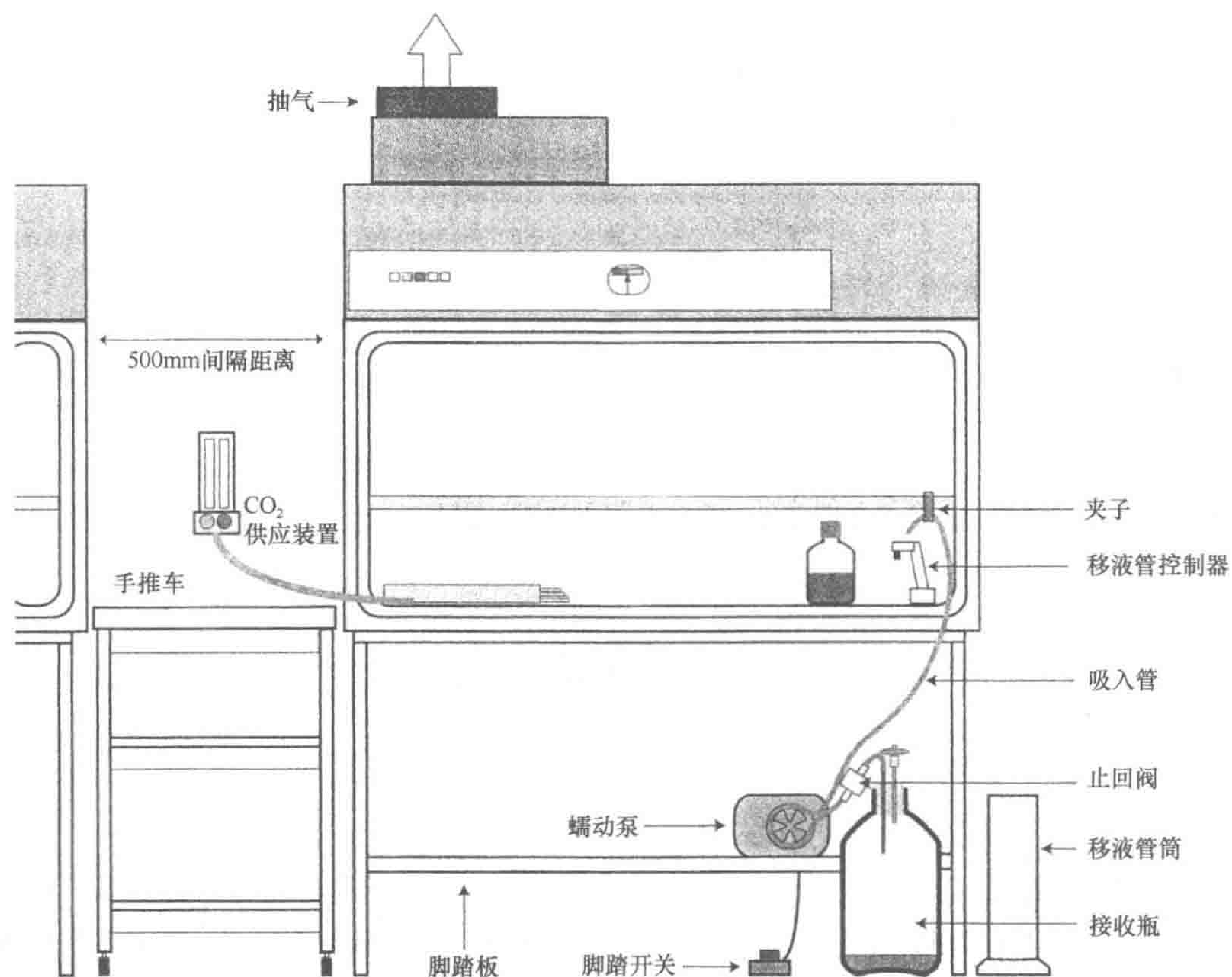


图4.1 层流工作站。使用Ⅱ级生物安全柜的层流工作站的建议布局。生物安全柜右下方显示的是蠕动泵，通过止回阀与收集容器相连，并带有一个激活蠕动泵的脚踏开关。蠕动泵上的吸入管通向工作区，同时将用过的培养基运送至接收瓶中。接收瓶通过过滤器向外排气以阻止悬浮微粒向室内扩散。气体混合器上的导气管是使CO_2混合到空气中

表4.2 Ⅱ级生物安全柜

级别	流入速度		排出气体（%）	再循环气体（%）	增压压力[a]	管道	排气故障报警
	ft/min	m/s					
A1	80	0.4	30	70	N/A	共用	否
A2	100	0.5	30	70	–ve	共用	否
B1	100	0.5	60	40	–ve	专用	是
B2	100	0.5	100	0	–ve	专用	是

a 周围所有受污染的静压箱的增压压力；N/A. 不适用；–ve. 负压

（3）检修。将生物安全柜安放到位后，检修起来方便吗（咨询售后服务工程师而非销售人员）？

（4）功能效率。来自其他安全柜的气流、室内通风或独立的空调设备会干扰生物安全柜工作区的整体性吗？也就是说，由于干扰会有受污染的空气进入或悬浮微粒泄漏吗?如果遇到这种情况，则需要两个生物安全柜之间3000mm（10ft）的面对面间隔距离，以及至少500mm（2ft）的横向间隔距离。在安装完毕后需要立即安排一个在生物安全柜方面有经验的技术人员进行专业测试。

（5）舒适度。有些生物安全柜的操作台下面有碍事的管道，没有给你的双膝留下任何空间；

上面的灯或其他辅助设备会碰到你的头部，或者有屏风模糊你的视线。需要强调的是，经常使用生物安全柜的人在购买之前要坐在台前，模拟正常使用。注意要考虑以下问题。

(a) 舒适地坐在安全柜前，身体靠近得足够进行工作时，膝盖能舒适摆放吗？你的手不用费力前伸就能到生物安全柜的至少1/2处吗？

(b) 脚踏板的位置合适吗？

(c) 不让脖子承受拉伤之痛就能清楚看到你正在做的工作吗？

(d) 照明设备方便够用吗？

(e) 工作台面容易拆卸进行清洗吗？

(6) 噪声水平。有噪声的工作台更易使人疲劳。

(7) 排气。生物安全柜可以侧向排气或者从顶部排气。一般来说，顶部排气会更容易与排风管道连接（专用或公共管道），而如果天花板高度有限的话则需要侧向排气。

(8) 内部。工作区内及操作台方在有液体溢出的情况下能方便清洗。

(a) 分开的操作台更容易挪移，但溢出物会困在相邻部分的间隙中。

(b) 一个带孔的操作台更容易使溢出物通过；最好使用前后排风的实心操作台。

(c) 在抬动生物安全柜时，操作台边缘应是光滑的，若边缘锐利，在清洗安全柜外部时容易被划伤。

(9) 玻璃屏。前屏应该被设计成能上下移动或完全移开，这样方便对笨重的组织培养设备清洗处理。但别忘了，如果移走前屏，生物安全柜就不会给你本人、操作者或者培养物提供应有的保护。

(10) 紫外线。紫外灯很有用，往往会安装在一些生物安全柜中。尽管不会到达操作台边缘或者边缘之间的缝隙中，但必须有足够的覆盖范围。注意一些塑料对紫外线敏感，因此一定要向供应商核实，安全柜的塑制前屏和后屏不会在紫外线照射下降解。

4.2.2 手推车

有必要在洁净台旁边放置一台可移动的手推车，便于放一些实验中随时要用到的物品（表4.3)。手推车要方便停放在两个相邻生物安全柜之间，并且能容易移走，以便对安全柜进行维修。手推车也可用于取放生物安全柜中的实验材料及服务人员新买的基本物品。稍大的手推车也用来将无菌室内被污染的玻璃器皿和用过的物品转移到洗涤区进行清洗。手推车应该停放在方便使用的地方（图3.3，图3.4，图4.1)。

4.2.3 无菌液体处理——移液和分液

吸管 吸管应是吹出式，吸管宽头有利于快速转移液体。最大刻度在顶部而不是尖端上。应把吸管收集在移液管筒内消毒液里，每个工作区配备一个。

可重复使用的玻璃吸管或带刻度的一次性塑料吸管都能使用（参见下面部分)，但巴斯德(Pastettes) 玻璃吸管最好作为一次性吸管，使用后应丢入安全的玻璃废物筒里，而不是放入移液

管筒里。或者用一次性塑料巴斯德吸管来替代。

表 4.3 耗材

物品[a]	规格	作用
移液管	1mL、2mL、5mL、10mL、25mL	抽取和分装培养基、试剂和细胞
培养瓶	25cm^2、75cm^2、175cm^2	原代培养和传代
培养皿	3.5cm、5cm 或 6cm、9cm 或 10cm	原代培养和传代；克隆
多孔板	4 孔、6 孔、12 孔、24 孔、96 孔	重复取样
无菌容器		无菌液体的存放
样品罐	50mL	组织存放
通用容器	30mL	存放样品、培养基、组织和细胞通用容器
Bijou 瓶	5mL	小量样品存放
离心管	15mL、50mL、250mL	细胞离心
玻璃或塑料瓶	100mL、500mL	培养基的制备和存放
冷冻管	1mL、2mL	冷藏（参见方案 15.1）
注射器	1mL、2mL、5mL、10mL、25mL	抽吸和分装小药瓶中的黏性液体及小容量液体
注射器针头	21~23G	从样品瓶中抽吸
	19G	分装液体和细胞
滤器		除菌
注射器针头	13mm、25mm、47mm	小容量除菌
瓶盖或培养瓶	47mm	大容量除菌
手术手套	小号、中号、大号	保护操作人员免受生物危害、溶剂和毒物的伤害
无尘棉签	50mm×50mm	擦洗工作台面
纸巾	各种	擦掉溢出液
消毒剂		
70%异丙醇或乙醇		擦拭工作台面
次氯酸钠		废液消毒

a 其他资源见附录Ⅲ，一般供应商见附录Ⅳ

吸管容器 即使使用塑料吸管时，尤其是吸管不能一一包装时，要考虑使用吸管容器。吸管容器能保持生物安全柜中吸管整洁，不用时可以合上盖子。玻璃吸管通常放在铝制容器或不锈钢容器内灭菌，方形容器［75mm×75mm×(300~400)mm］比圆形容器好用，因为方形容器更易放置且不会在操作台上滚动。可在容器顶部和底部安置硅胶垫防止操作过程中吸管碎裂。

塑料和玻璃吸管 许多实验室均采用一次性塑料吸管，其优点如下：已包装和灭菌，没有玻璃吸管易碎等不安全问题，不用清洗（吸管的清洗相对困难），也不用加棉塞（加棉塞很单调）；缺点是非常昂贵，如果单独包装，用起来比较慢。如果是成批包装，除非包装在一起，否则将造成很大的浪费，建议使用该方法（参见 5.3.5 节）。塑料吸管也会显著增加处理的难度，特别是它们在被丢弃前，需要进行消毒处理。

或许可以发现，即便加上雇用洗涤人员的费用和用于清洗、干燥和灭菌的能源费，在一个大

型实验室中使用玻璃吸管也是最经济划算的。然而，由于使用方便、操作安全和可靠性高（洗涤少、灭菌失败）等优势，实验室一般更趋向于使用一次性塑料吸管。

移液管筒 移液管筒（有时也称吸管架）主要用于处理用过的吸管，由聚丙烯材料制成，在实验室独立放置，一个工作台配一个。在清洗玻璃吸管或处理塑料吸管前，置于移液管筒内的移液管要被消毒剂完全浸泡2h以上（参见6.8.6节）。

移液管控制器 简易加样是常规组织培养中最常遇到的操作之一。使用洗耳球或其他专用移液装置价格便宜、使用方便，但电动移液管控制器可大大提高加样速度、准确度和可重复性（图4.2）。移液管控制器带有独立或内置的吸气泵，能进行主动的和重复的操作。选择移液管控制器的主要考虑因素是连续使用过程中该设备的重量和手感。最好在购买前先试一试，通常移液管控制器的插吸管部位有一个滤网，以减少污染物的转移。有的滤网是一次性的，有的滤网经灭菌后可重复使用（参见图6.2显示的移液管插入移液装置的正确方法）。

移液器 移液器源于Eppendorf微量移液器，用于10~200μL的液体分装。由于现在的工作范围扩大到了5mL，再用“微量移液器”一词就不是很合适了，所以常称为移液器（图4.3a）。一般分为单吸头移液器和多头移液器（用于微量滴定板）两种（图4.3b）。



图4.2 移液管控制器。配合普通刻度吸管工作的电动加样器

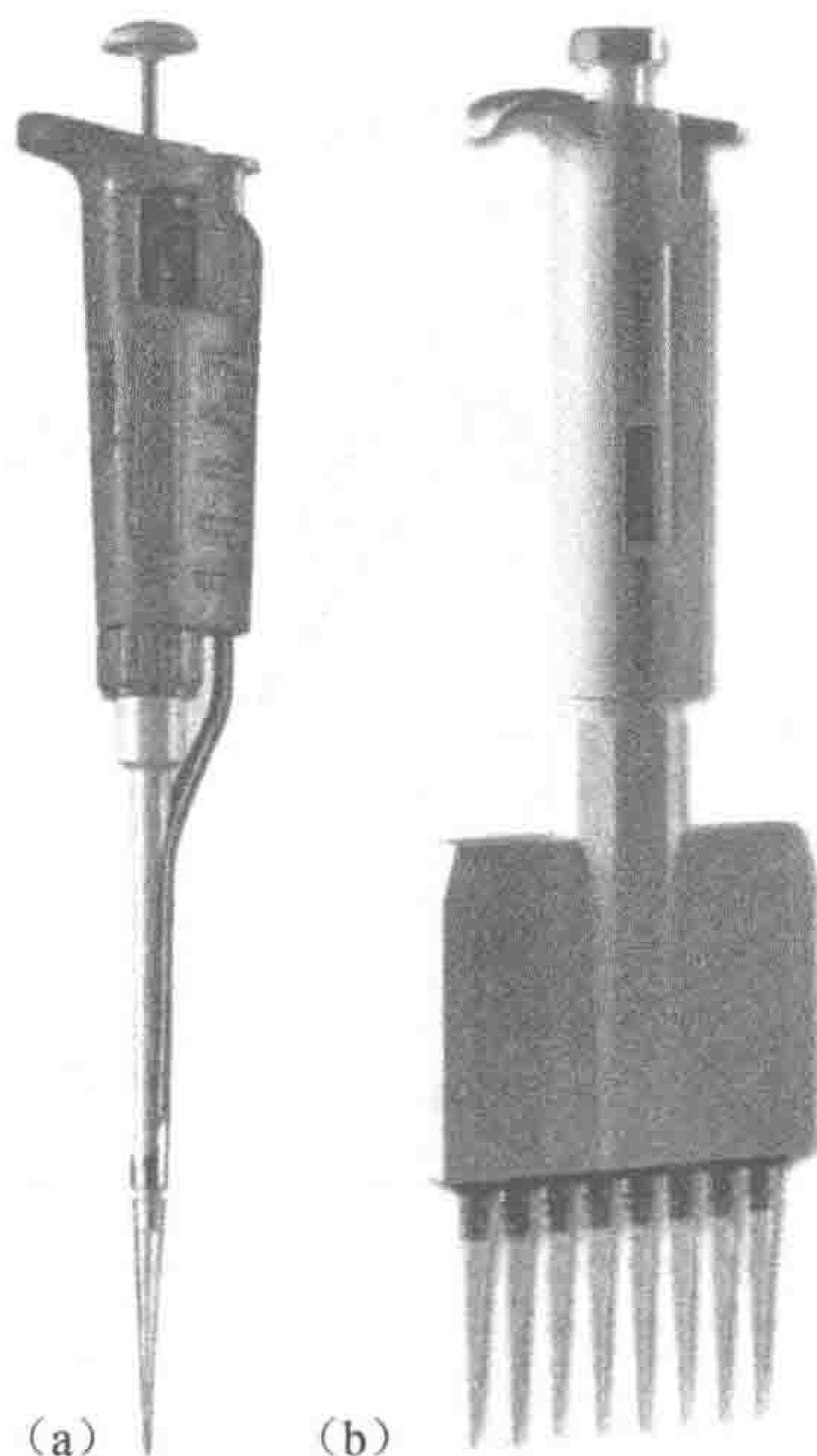


图4.3 移液器。(a)可变量程单道移液。可用于规定的容积。移液器本身不必灭菌，但要与灭菌的塑料枪头一起使用；(b)多道移液器。该移液器可一次安8个塑料枪头。也有可安4个或12个枪头的（由VWR-Jencons提供）

通常认为，移液器内部没有足够的空气去破坏无菌环境。然而，情况也并非完全如此。例如，如果要进行某个细胞系的连续继代培养（相反，短期实验中，细胞在实验之外不进行繁殖），细

胞系的安全性至关重要，必须使用常规的带有塞子的吸管。取样时，吸管伸入容器的部分应完全无菌。如果所用的容器小得足以阻止与移液器非无菌部分接触，那么就可以允许使用移液器，但吸头内应装有一个防止交叉污染和微生物污染的过滤器，否则，就有被移液器非无菌部分引起微生物污染的危险，或者气溶胶或液体被抽吸到移液器杆部，就会造成不明显但具有潜在的更严重的交叉污染。

常规的传代培养中，要求操作迅速以防止微生物污染或者交叉污染的发生，但对其精确性要求不高，这时最好使用传统的刻度移液管。但在精确性要求高但不要求细胞进一步传代的实验，使用移液器效果会更好。

可以买散装吸头，然后到实验室包装、消毒，也可以买已消毒、放置于吸头盒的吸头，前者虽然便宜，但实验室准备起来十分烦琐；后者使用方便，但费用较高。有的吸头盒可重装吸头和重新灭菌使用，这样做既便宜又实惠。

注射器 在一般操作中，尽管不建议经常性使用注射器和针头（这是对安全、消毒及操作细胞时针头出现的切力等问题的考虑），但可以将过滤装置和针头连到注射器上，既可进行过滤，也可用针头从密封的小瓶内抽吸试剂（药品、抗生素或放射性同位素等）。

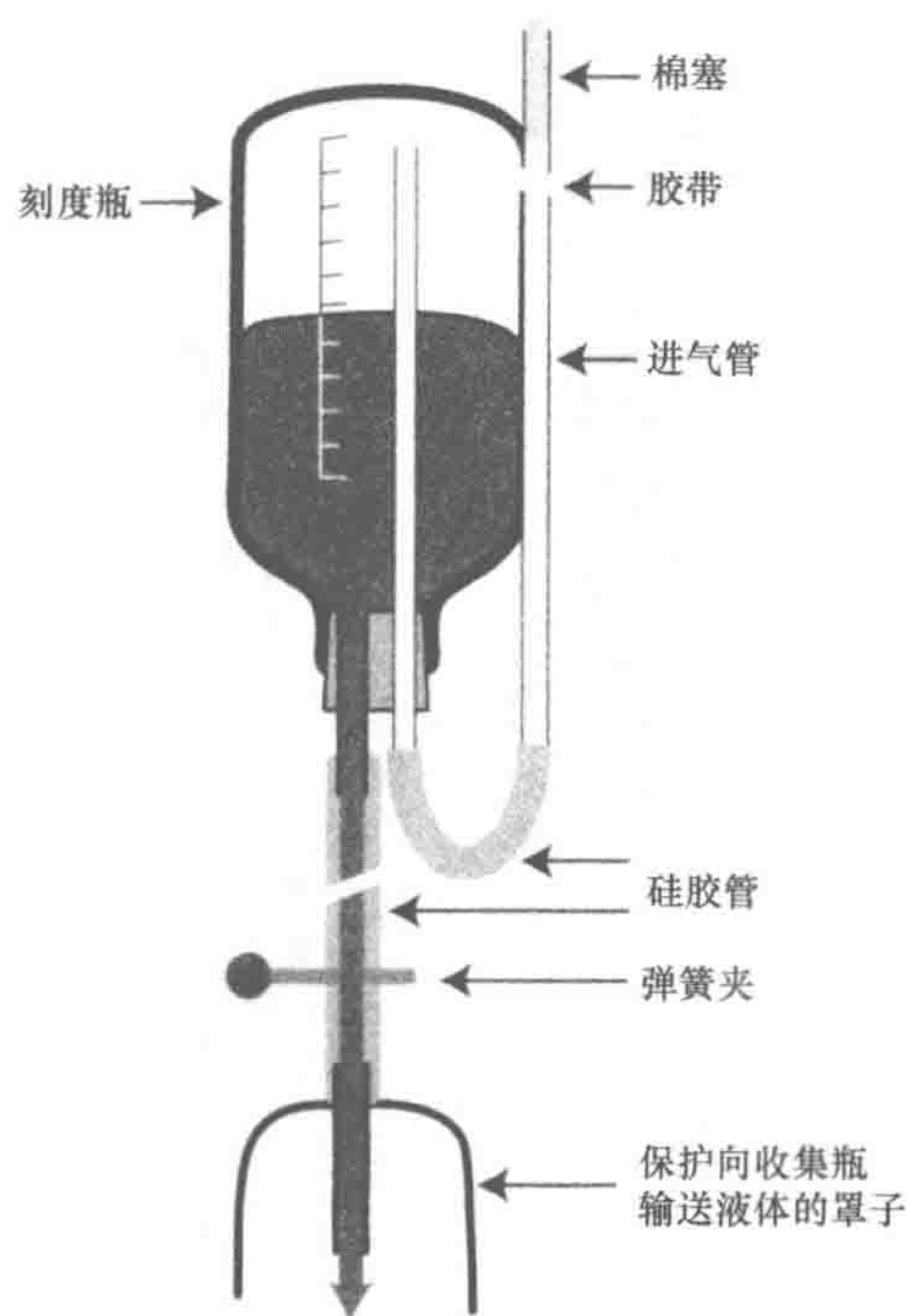


图 4.4 刻度瓶分液器。将双孔塞插入刻度瓶瓶颈内，一根导出管与一个分液罩连接，并用弹簧夹夹在上面。一条入口线用于平衡瓶内外空气。瓶塞和刻度瓶分开灭菌，需要时，可把瓶塞盖在任何装培养基的标准瓶上（引自John Paul 博士的原创设计）

大容量分液 如果有大容积的培养基或多瓶大容积的培养基需要分装，那最好使用蠕动泵（图 4.6）。另外，培养基也可以用一个刻度瓶或长颈瓶（图 4.4）进行分装。

重复分液 可以通过注射器活塞的加速运动进行小体积重复分液（图 4.5a），或者通过与双向阀接连的储液器——Cornwall 注射器的反复注射完成（图 4.5b）。这类分液器的主要问题是阀门堵塞，解决办法是：高压蒸汽灭菌后不作烘干处理，使用前后，把用无血清的培养基或者盐溶液冲洗注射器。也可以用蠕动泵进行连续重复分液，其优点在于可通过脚踏开关控制分装，无须用手操作（图 4.6a）。但在安装该设备时一定要注意避免储液罐上的导管和输液终端受到污染。如果需要分装大量瓶子时，这种方法就很适用。另外，只需导液管进行高压灭菌，就能在 10~100mL 保持分液的高精确性和重复性。需要预先存放一批灭菌的导液管，以便在发生偶然性污染或细胞类型或试剂改变时能及时被更换掉。

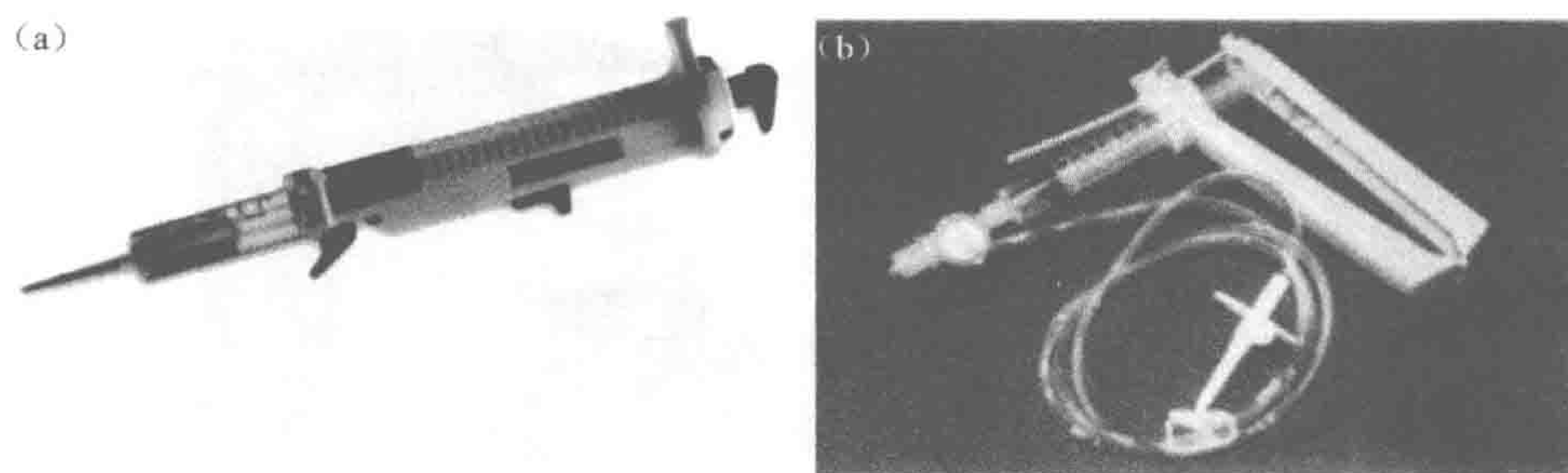


图 4.5 注射分液器。(a) 由拇指推动使注射器活塞加速运动的连续分液器 (Repette，由 VWR-Jencons 提供)；(b) 带有与进气管 (内含滤膜) 相连的双通阀的重复分液注射器 (Cornwall Syringe 研究实验室提供)



图 4.6 自动分液器。(a) Perimatic Premicer 自动分液器，适用于 1~1000mL 的重复分装和稀释。如果将该设备用于无菌操作，只要输送管高压灭菌即可；(b) Zippette 瓶口分液器，适用范围为 1~30mL，可以高压灭菌 (由 VWR-Jencons 提供)

自动化装置 目前，机器人系统正被广泛应用在大规模细胞生产和高通量筛选上面 (参见 21.5.2 节)。微量滴定板 (参见图 7.3) 的引入带动了自动分液器、微孔板检测仪和其他辅助设备 (图 4.7) 的使用。Corning Transtar 等转移装置很容易将样品从一板接种到另一板上 (图 4.8)。涉及的设备还包括孔板振荡器和离心管套座等。这样的设备很多，这里无法一一提及。基于微量滴定的高通量筛选技术目前已被广泛应用于制药行业 (参见 21.5.2 节)，这也代表了自动分液装置的主要开发利用成果。

系统的选择 无论是选择简单的人工系统，还是选择复杂的自动化系统，都要遵循以下 5 个标准：①使用简便和工作高效；②省时、节约、增效；③在连续或平行分液时精确、具有可重复性；④易灭菌，影响精确性和可重复性；⑤机械的、电子的、化学的、生物的和辐射的安全性。

▲安全提示 大多数移液装置排出液体的速度高于正常的人工操作，但很容易产生气雾，使用有潜在生物危害性的培养底物时要非常小心。

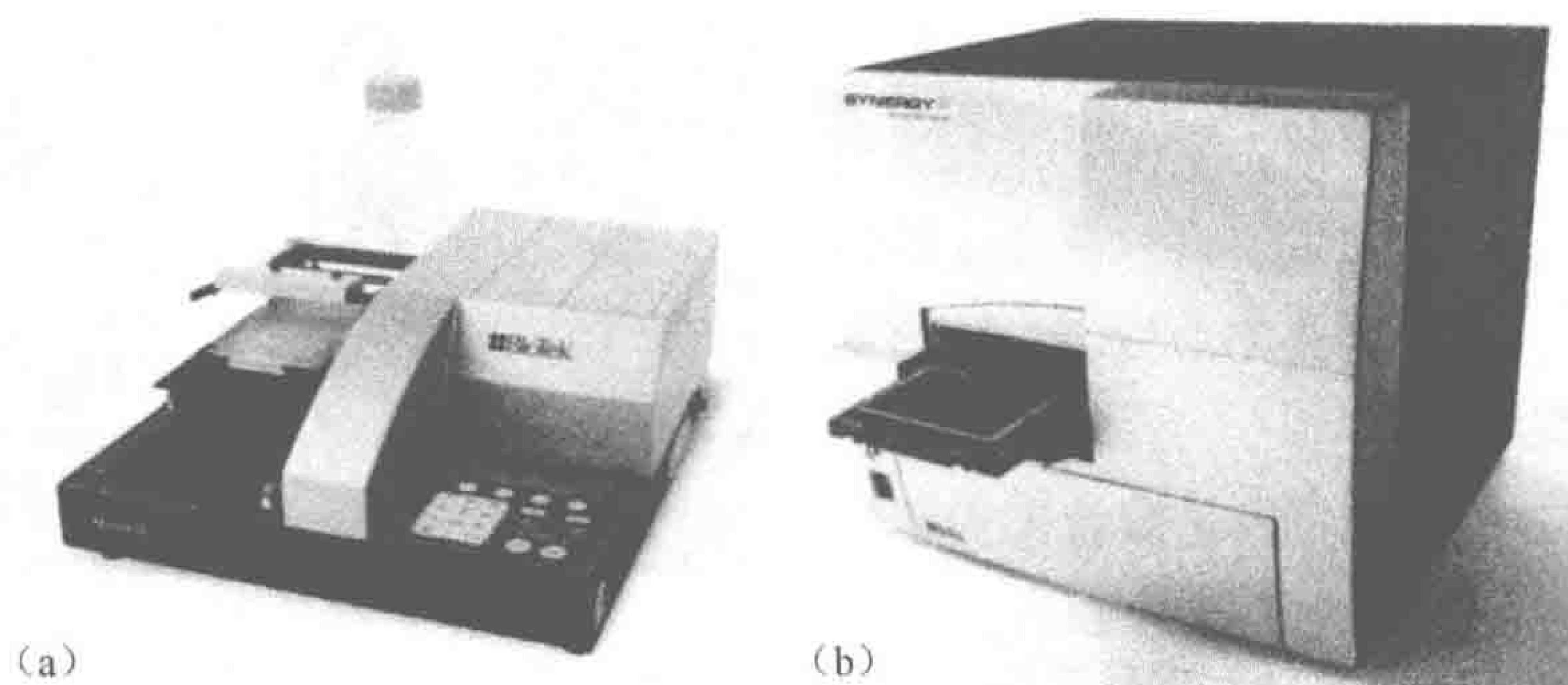


图4.7 平板加样机和酶标仪。（a）用于24孔板、96孔板和384孔板的MicroFill™微孔板自动分液器；（b）Synergy 2™酶标仪，用于检测吸光度、荧光和发光（由BioTek提供）

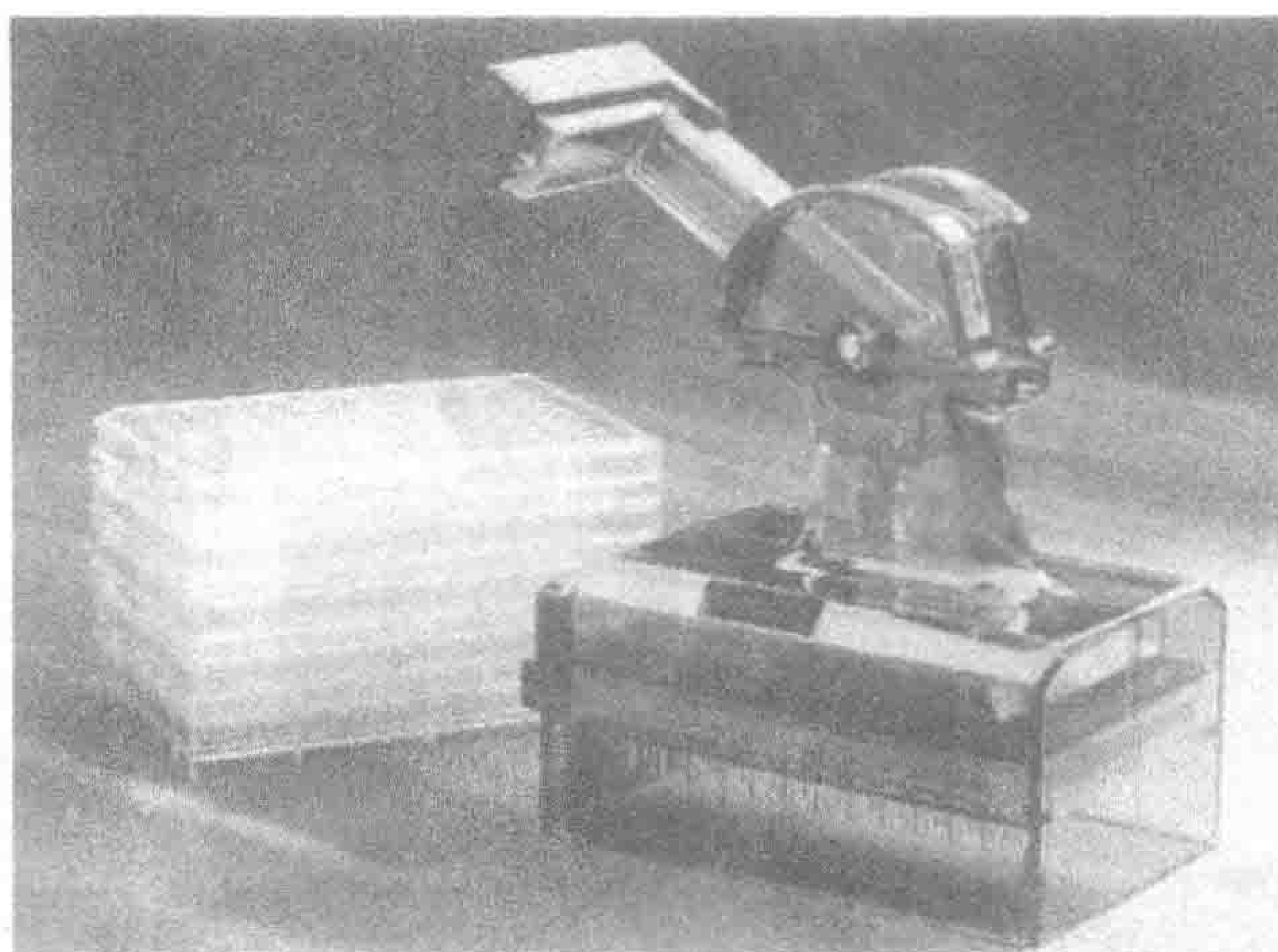


图4.8 微量滴定移液装置。微量移液装置Transtar（Corning）可用于接种、转移培养基、影印接种和与微量滴定板有关的其他类似操作。能同时对培养板的96个孔加样（经Corning Life Sciences同意转载）

抽气泵 蠕动泵可用于除去培养瓶中废旧的培养基或其他试剂，并能直接将废液收集到放有消毒剂（参见6.8.6节）的通风接收容器中（图4.9a、b，图4.10），尽可能减少将气雾剂直接排放到大气中所带来的危险，特别是通过棉塞或微孔滤网抽气。抽气瓶的排气管至少要比进气管口高5cm（2in），这样废液就不会倒流入抽气管。应该在与抽气泵连接的管道中加一个止回阀（如Cole-Parmer#CZ-98553-12），以防止废液倒流入培养瓶中。另外，在吸入管道（图4.9c）中安一个自动关闭阀（如Nalgene Quick Disconnect #6177-0250，Thermo Scientific）后可允许更换新的移液管或废液收集器，同时不用担心废液溢出。应定期检查管道有无破损，抽气泵应由自己脚踏开关操作。

可用真空泵代替废液收集器下游的蠕动泵（图4.10b），要在收集器和抽气泵之间安装一个疏水微孔滤器和一个分水器以避免空气悬浮微粒和废液进入泵内。不要用真空泵从含有次氯酸盐的收集器中吸入空气，因为氯气有毒，会腐蚀真空泵。这里建议使用非氯消毒液，如Virkon（经安全委员会批准），也可以在收集器已装满，消毒处理前30min加入消毒液。避开真空管，因为若真空管被废液污染，则非常难清洗。

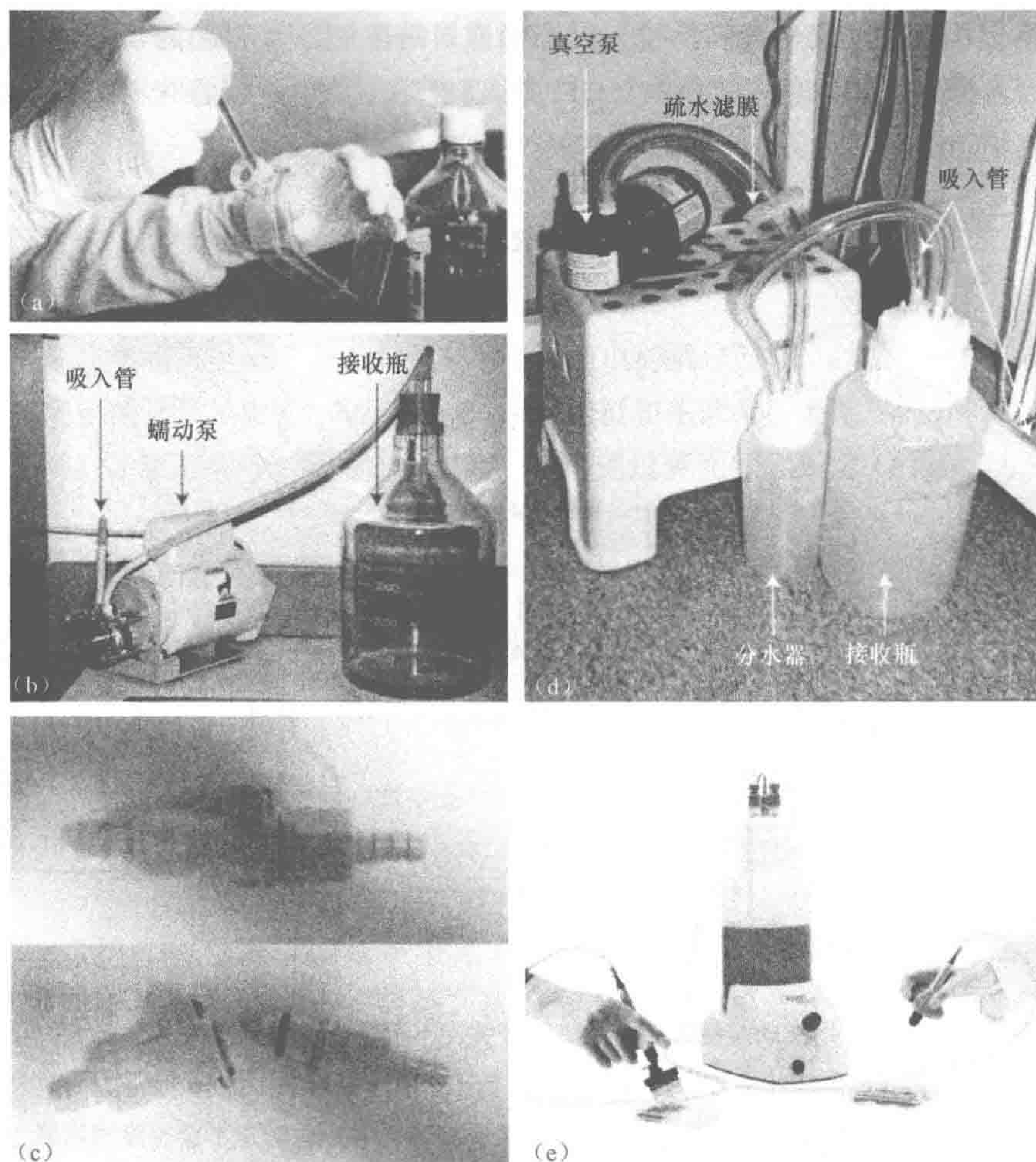


图 4.9 培养基的抽吸。(a) 移液管通过管子与蠕动泵相连弃除培养瓶中的培养基；(b) 从生物安全柜下来的吸入管通过蠕动泵将废液引至收集瓶中；(c) 在更换吸入管时，吸入管上的自动关闭阀可用来阻止废液泄漏（Nalgene™，Thermo Scientific，#6177-0250，图片由 Carl Gregory 提供）；(d) 真空泵，可代替 (b) 中的蠕动泵使用。疏水滤膜和分水器用来保护真空泵免受残留液体带来的伤害（由 Amanda Capes-Davis，CMRI 提供）；(e) 用 Vacusafe™ 真空泵移除多孔板内的液体。右侧接头与普通移液管和培养瓶连用（由 Integra 提供）（参见 4.2.3 节）。在泵运行时不能使用次氯酸盐或其他腐蚀性的消毒剂；在工作结束后添加消毒剂，并留足够长的时间完成消毒

4.2.4 倒置显微镜

一个简易的倒置显微镜是必要的（图 4.11a），也不必过分强调它在常规观察培养物检测细胞形态变化（参见 12.4.1 节、18.4 节；图 12.1）和可能出现的微生物污染（参见 14.3.1 节；图 14.2）中有多么重要。如果需要，要有一个足够大的载物台，在它和聚光镜（参见 21.2.2 节）之间可容纳大的转瓶。显微镜应该配一个光电管以便用照相机进行数字化记录或者监视器观察（图 4.10b），没有必要买一台大型的、价格昂贵的研究级显微镜。一般要求配置带有

长工作距相差光学系统（聚光镜和物镜）以补偿塑料培养瓶厚度引起的误差。目前，用于观察活细胞的荧光标签［如绿色荧光蛋白（GFP）］已被广泛使用，这意味着也要考虑准备一套荧光光学系统了。

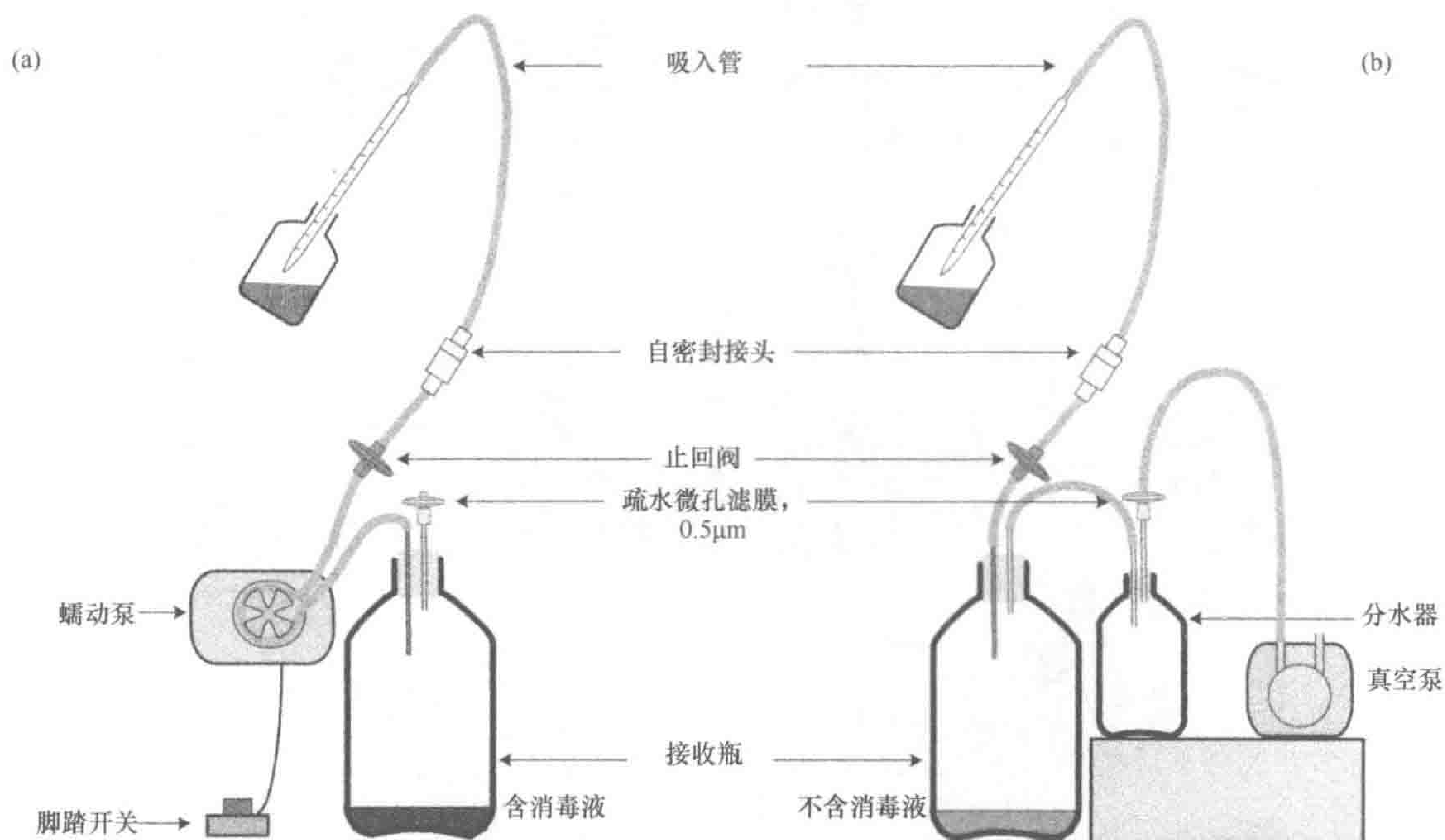


图 4.10　抽吸泵的构造。（a）用蠕动泵抽吸。注意脚踏开关，不至于使蠕动泵连续工作；（b）用真空泵抽吸。两个系统配有一个疏水微孔滤膜阻止悬浮微粒释放，吸入管上带有一个阻止回流的止回阀。也可以在吸入管上加一个自密封接头，这样即使在更换管道系统一端的移液管时也不会有废液泄漏

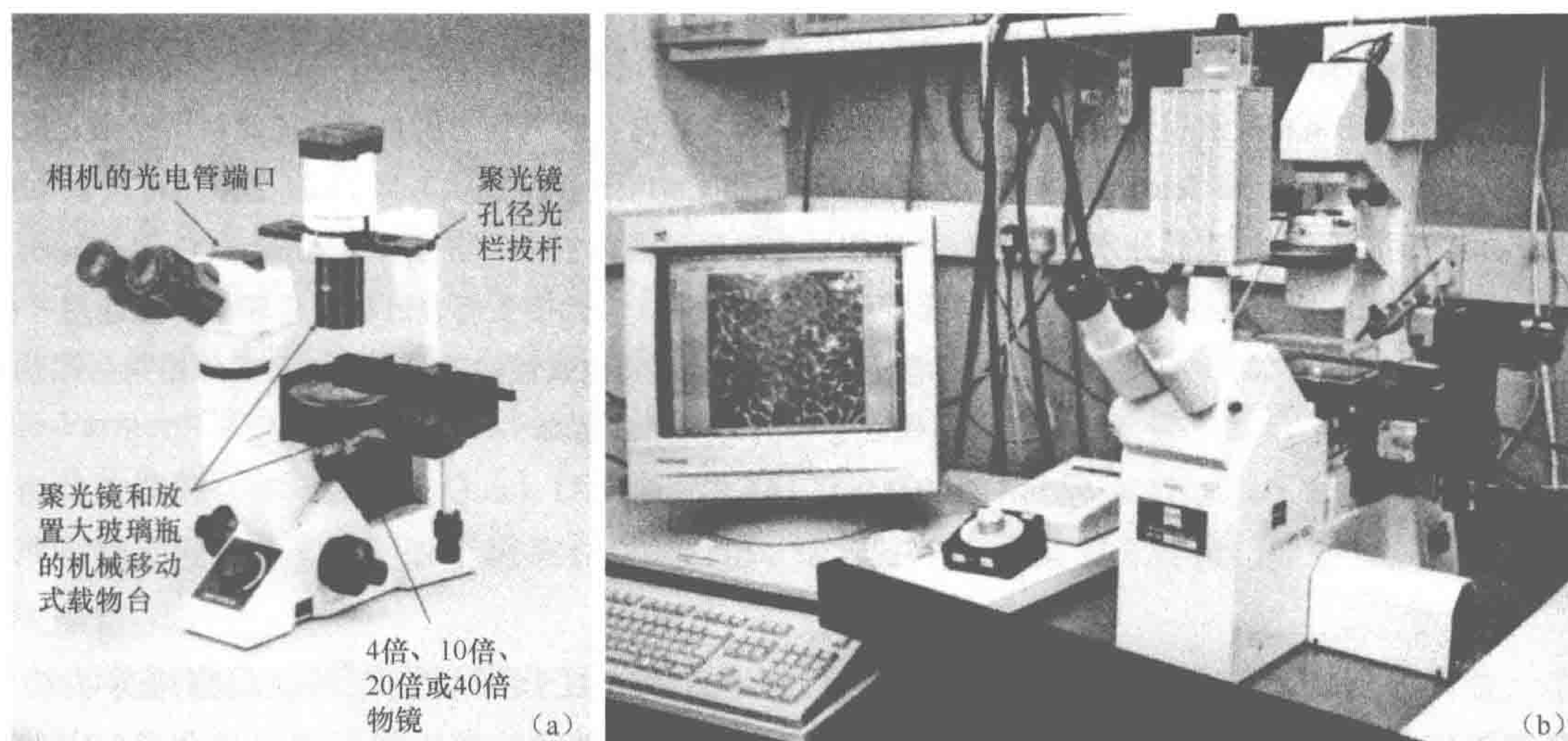


图 4.11　倒置显微镜。（a）Olympus CKX41 倒置显微镜，配有相差光学元件，以及带端口的三目镜筒，用来安装数码相机（图片由 Olympus，UK，Ltd.提供）；（b）装有 CCD 照相机的 Zeiss Axiovert 倒置显微镜，可直接冲洗图片，当与电视录像系统相连接时，还能进行延时摄像（参见 18.6 节）；右侧是微量注射器端口（由 Beatson 研究所提供）

标记环（尼康公司，目标标记）是倒置显微镜的一个有用附件，这个装置可以插入物镜转换盘中代替一个目标物，也可用来标记培养皿底面对一个集落或细胞团进行定位，然后挑选出该集落（参见 16.4 节，图 16.8、图 16.9）或在培养物中形成的一个特别有趣的区域。

4.2.5 照相机和监视器

一台数字静物照相机足够用来进行记录拍摄，而电荷耦合器件（CCD）照相机则能够进行实时观察和长时间影像记录（参见 18.6 节）。CCD 照相机和图像分析是重要的分析工具，可用来定量分析细胞行为，如细胞信号转导和细胞迁移，也可通过荧光原位杂交（FISH）方法定位细胞内成分。

目前，数码相机和监视器在组织细胞培养分析、新职员和学生的培训，以及显微操作方面已成为有用的辅助工具（图 4.11b）。对于常规的数字记录，一般选择分辨率高但灵敏度不太高的照相机即可，因为普通照相机的灵敏度就够用了，而灵敏度太高会适得其反，导致过度照明。

4.2.6 解剖显微镜

解剖小块组织（如胚胎器官或小型无脊椎动物组织）需用解剖显微镜（图 4.12）。解剖显微镜也可用于单层克隆计数。另外，从琼脂上计数并挑选小集落时，也必须用解剖显微镜。

4.2.7 离心机

需要对细胞悬液定期离心，以增加细胞浓度或清除掉某种试剂。一台按比例制动控制的小型台式离心机（图 4.13a）就能满足大多数实验的需要。需要制冷但不是必需，如果要求离心机长时间旋转，但会产生一个较大的印迹，在室温条件下就能防止细胞过热。离心速度在 80~100*g* 时可获得理想的细胞沉淀，沉降速率稍高就会造成细胞受损和加速血小板凝集。如果需要离心大量悬浮培养物（参见 21.1 节），则需要一台大容量低温离心机，如 4×1L、6×1L（图 4.13b）。

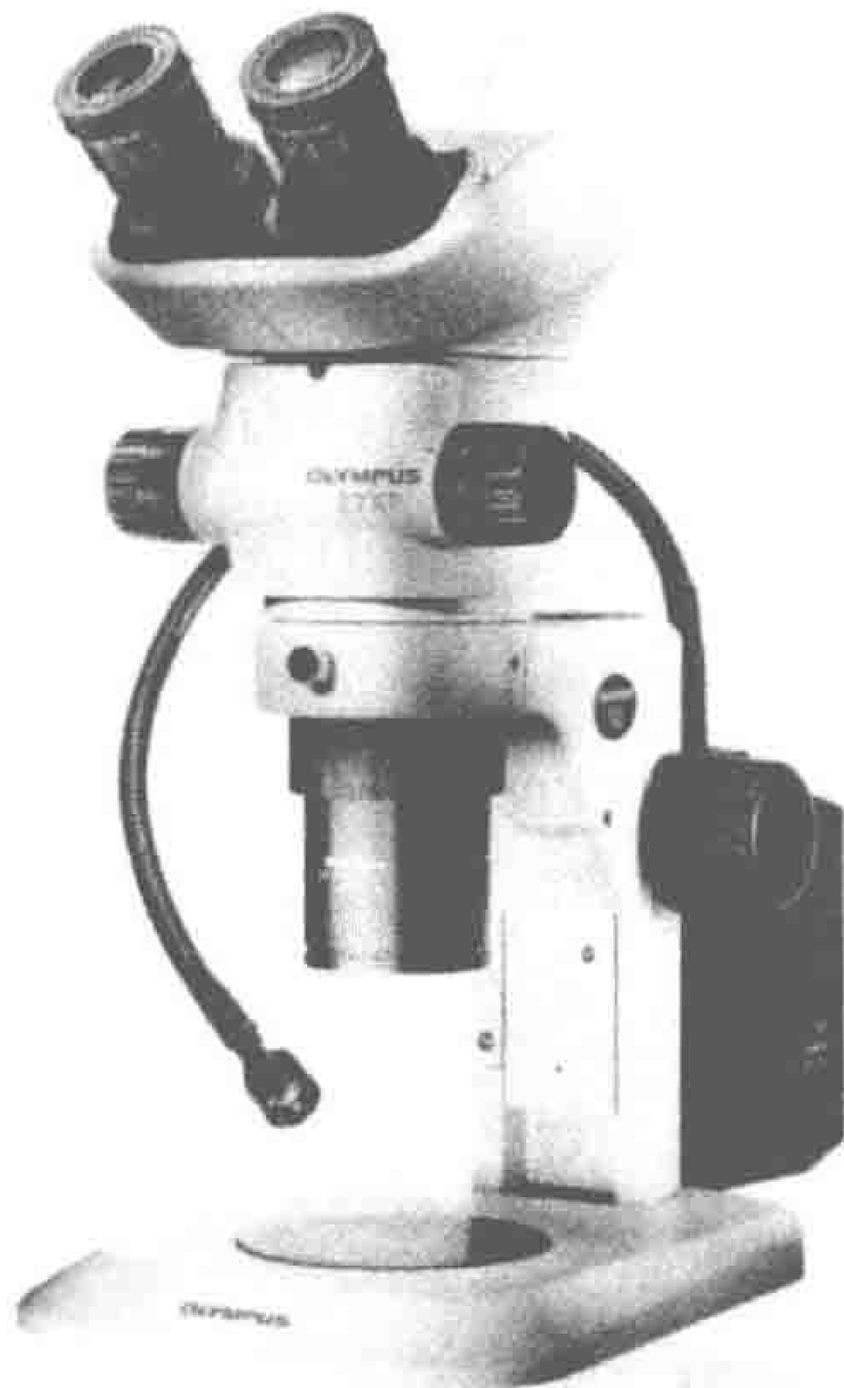
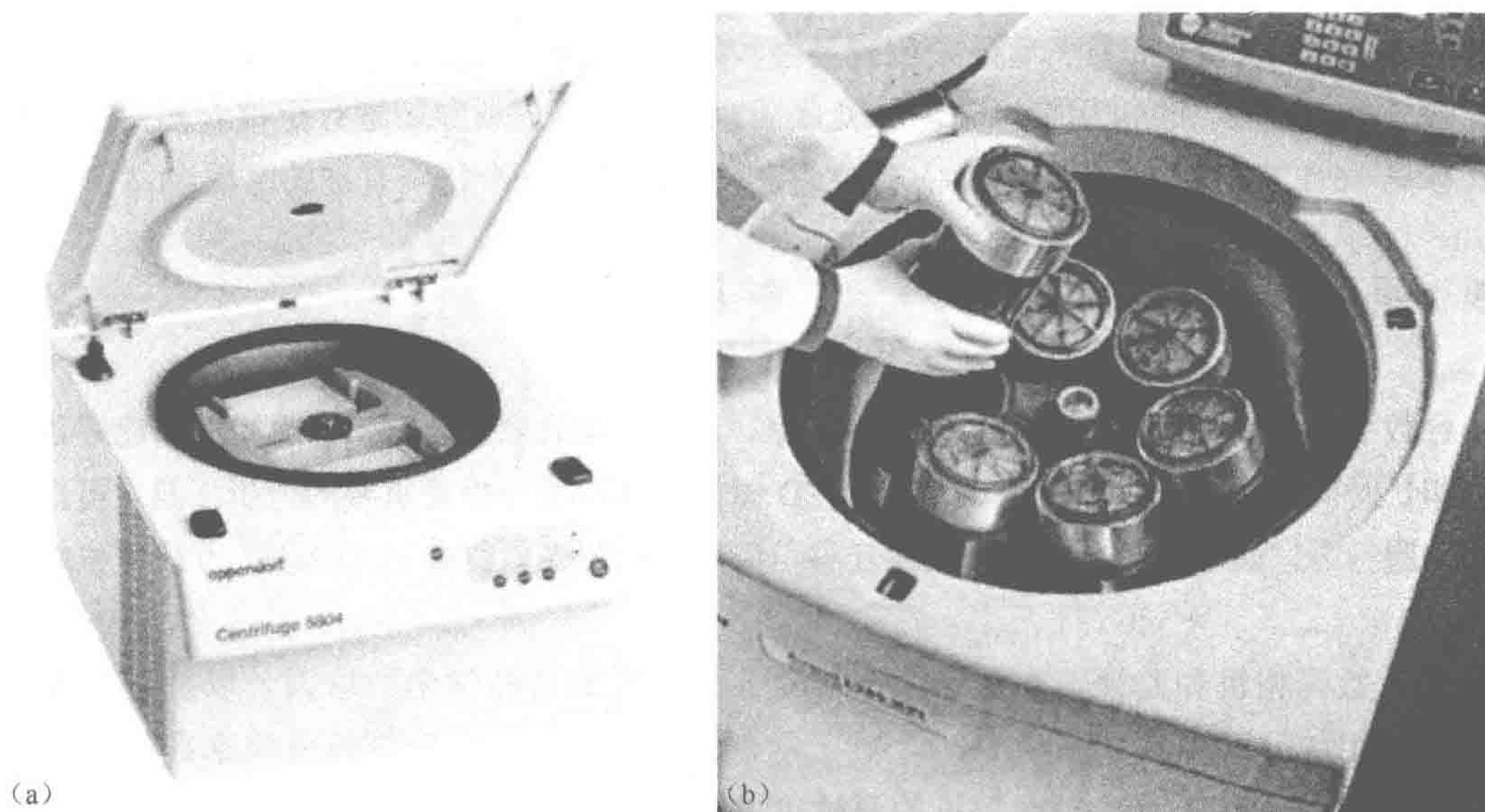


图 4.12 解剖显微镜。Olympus SZ61 解剖显微镜。注意平台底座，它使解剖工作更加舒适（由 Olympus 提供）



(a) (b)

图 4.13 离心机。(a) 此处展示的是配有微孔滴定水平转子的小型、非制冷台式离心机（Eppendorf 5804; Copyright©2014，由德国 Eppendorf AG 公司提供），但也可以配以其他转子；(b) 大容量离心机，6×1L，制冷（Beckman Avanti J-26S，由 Beckman Coulter 公司提供）

4.2.8 细胞计数

细胞计数有许多不同的直接或间接方法（参见 23.1.1 节）。

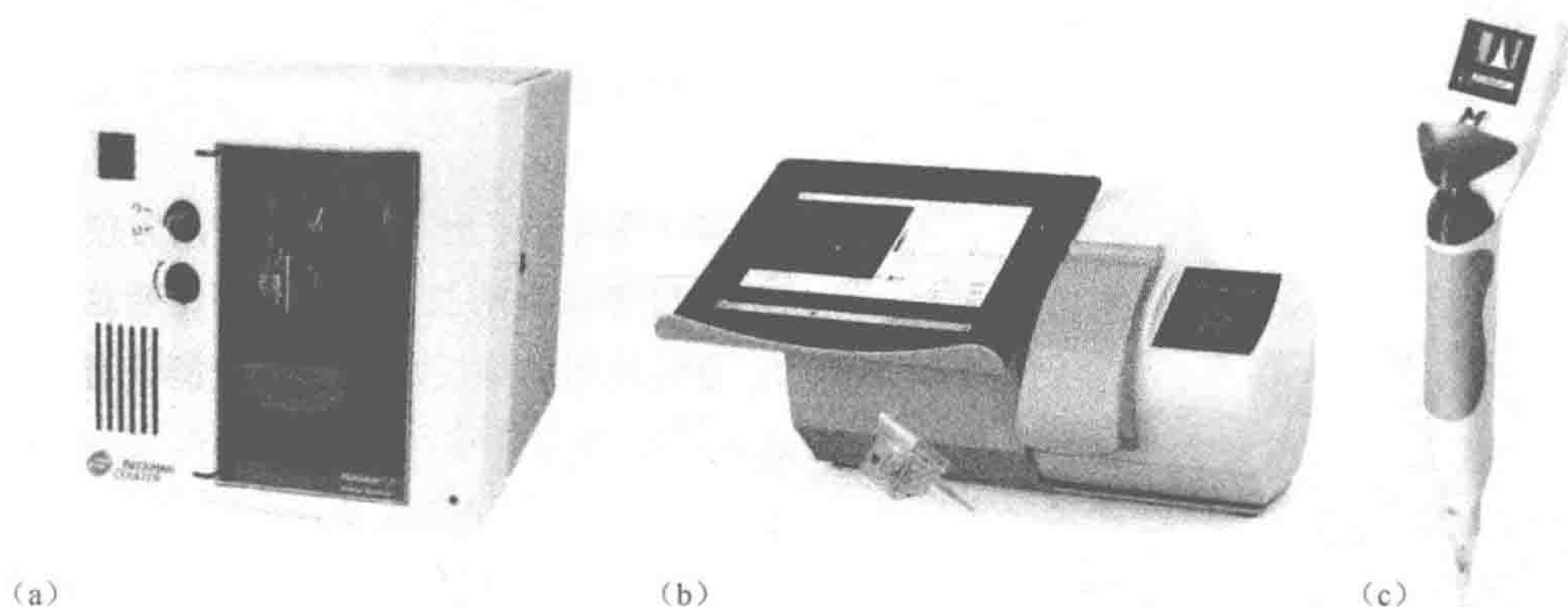
血细胞计数器 最简单直接的方法就是利用倒置显微镜上带有厚盖玻片的刻有经纬线的载玻片（参见 23.1.1 节）。血细胞计数器是最低廉选择，还能通过染色测定细胞的存活力（见 23.1.1 节、24.3.1 节；图 23.1；彩版 17a；方案 23.1、24.1）。如果是常规使用，最好给每个人都分发一个载玻片和若干盖玻片。



彩版 17

电子细胞计数器 当培养的细胞系多于 2~3 个，并需要精确测量细胞生长动力学时，细胞计数器（图 4.14；另见图 23.2）最有优势。电子细胞计数器主要有两种（另见 20.1.2 节）。最早的一类电子计数器工作原理如下：当细胞穿过一个狭窄的孔时，就会产生电阻抗信号，如 Coulter Multisizer（图 4.14a；Beckman Coulter 公司）或 Casy（图 23.3），另一种是通过图像分析进行工作的电子计数器，如 Nucleocounter（图 4.14b，Chemometec 公司）或 Sceptre（图 4.14c，EMD Millipore 公司）。台式流式细胞仪提供了另一种进行电子颗粒计数的方法；同时，如果需要，还可以进行其他指标的测定，例如，双乙酰荧光素（DAF）吸收法测定细胞活力、凋亡指数检测和 DNA 含量检测等。

细胞大小 许多中档或高级细胞计数器（参见图 23.3，图 23.5）都可以用来分析细胞的大小，并能直接或通过网络将数据下载到个人计算机（PC）上。



（a） （b） （c）

图 4.14 电子细胞计数器。（a）用电阻抗检测细胞数量（Multisizer；由 Beckman Coulter 公司提供）。（b）通过图像分析检测细胞数量（Sceptre；由 Merck Millipore 公司提供）。（c）手提式，可图像分析检测。

4.3 孵育和培养

4.3.1 恒温箱

如果没有温室（参见 3.2.5 节）可用，就需要买一个等效的干式培养箱。培养箱应足够大（每人占 50~200L，即 1.5~6ft^3），应装有一个温控装置，使温度变化控制在±0.2℃内；还应装一个安全恒温器，在培养箱过热时能切断电源，或者最好是在第一个恒温器发生故障时，安全恒温器能调控培养箱温度。恒温箱要耐腐蚀（不锈钢材质，而对干式培养箱来说最好用铝合金）、易清洁。最好选用双室、上下排列、独立控制的大培养箱，因为培养室越小，温度越好控制，如果其中一室发生故障或需要清洗，另一室仍可继续使用。此外，一室允许频繁使用，另一室则限制使用。即使有温室，有时为了方便，也需要在离工作台较近的地方放置一个培养箱以备胰酶消化时用。

许多培养箱都有一个加热水套，这有助于热气的均匀分布，避免形成冷区。这类培养箱也可在加热器损坏或断电时使温度长时间保持稳定。然而，新型高效保温和表面散热元件几乎完全解除了对水套的需要，大大简化了移动培养箱的任务（如果是带水套的培养箱，移动培养箱时，通常需把水套里的水排尽）。

培养箱的搁架通常是带孔的，这样有利于空气循环。然而，搁架上的穿孔会引起单层细胞培养时不规则的细胞分布，而且细胞密度也会随着搁架上孔眼排列方式而变化，这可能与相对于搁架孔上的接触点上方产生的气流有关，或者与打开室门时降温较快的有孔区域有关。尽管在常规细胞培养中可能没有问题，但是，在一些严格要求细胞密度均匀分布的实验中，培养皿和培养瓶还是最好放在绝缘瓷板或金属盘上。

4.3.2 湿式 CO_2 培养箱

尽管把密封的培养瓶中的细胞在普通的干式培养箱或温室中培养即可，但 Petri 培养皿、多孔培养板等器皿则要求有一个高湿和高 CO_2 分压的环境（参见 8.2.2 节）。控制气相最经济的方法

是把培养物放在一个塑料盒、厌氧瓶或培养小室内（图 4.15），往容器中充入合适的 CO_2 混合气，然后将容器密封好。如果培养皿没有完全占满培养室，可在小室内放置一个盛有水的开放式培养皿以增加湿度。



图 4.15 培养室。是 CO_2 培养箱的廉价替代品（由 Reeve Irvine 研究所提供）。上层架子，定制的透明塑料盒；下层架子，厌气罐（Corning—BD—Biosciences）

CO_2 培养箱（图 4.16）比较贵，但使用方便，对 CO_2 分压、温度和湿度等优越的控制性能，都说明这种费用支出是值得的。通过使用加湿托盘和 CO_2 检测装置控制 CO_2 密度就能达到控制箱内气体环境的目的（图 4.16b，图 4.17），CO_2 检测装置能驱动气流从培养箱进入培养小室，测定其中 CO_2 浓度，注射纯的 CO_2 进入培养箱弥补 CO_2 不足。空气通过自然对流在培养箱内循环，利用风机保持培养箱内 CO_2 水平和温度分布均匀。研究表明，自然对流式培养箱恢复得也很快，还能降低被污染的危险，但鼓风循环培养箱启动后，培养箱内 CO_2 浓度和温度能恢复得更快。壁面加热式培养箱也能降低培养箱内表面的真菌污染，因为即使在相对高的湿度条件下，该培养箱壁面也能保持干燥状态。通过用金属铜或铜合金也能抑制培养箱内壁的污染，如 Nuaire In-VitroCell 系列中的 CuVerro®。有些 CO_2 控制器需要隔几个月校正一次；使用金属线管或红外线探测器可大大减少气体外流，而且，许多 CO_2 培养箱可自动重置 CO_2 探测器的零点。

有研究显示，某些细胞更喜欢低于环境的氧浓度（参见 8.2.4 节和短篇综述 8.1）。此外，一个低氧浓度环境的需求说明了抗癌药物的活性（Bertout et al.，2008），同时对于人胚胎干细胞（hESC）（Lengner et al.，2010）的培养也十分必要。如果这对实验室是必需的，就有必要选择一个带有三气（包括空气、氮气和 CO_2）供应装置的培养箱，这样氧浓度可以通过提高氮气比例进行调节。

培养箱大小的选择取决于使用人数和培养物类型。5 名工作人员仅用微孔板培养细胞时，可以在一个中型培养箱中同时放 1000 个培养板（约 100 000 个培养物）或一次完成 10 个实验所需要的培养物。而一个用培养皿进行细胞克隆的人员仅能在培养箱中放置少数几个实验所需的培养皿。在两个叠放的培养箱中（图 4.16a），更偏向于使用较大的那一个，因为温度易控制、开启后恢复更快，同时更容易清理和维护。组织培养实验室在进行胰酶消化（图 3.2，图 3.3）等短期孵育时可以使用小型培养箱，如果没有一个单独的检疫室可用的话，就需要有一个单独的小培养箱来隔离。在 CO_2 培养箱中进行玻瓶培养，尤其大玻瓶培养，是 CO_2 培养箱一种很不经济的使用方式，它们在普通培养箱或温室中孵育就可以了。若需要 CO_2，可以用气缸或 CO_2 供应装置向培养瓶充 CO_2 气体。然而，如果放置在一个 CO_2 培养箱中，使用透气帽就可以平衡 CO_2。

培养箱，特别是湿式 CO_2 培养箱必须经常清洗（参见方案 5.4；14.1.4 节），所以其内部应易于拆卸，不留难以到达的缝隙和死角（图 4.16b）。培养瓶、培养皿或装它们的盒子从培养箱转移至生物安全柜后，在打开之前，应该用乙醇对它们擦拭（参见 5.3.1 节）。

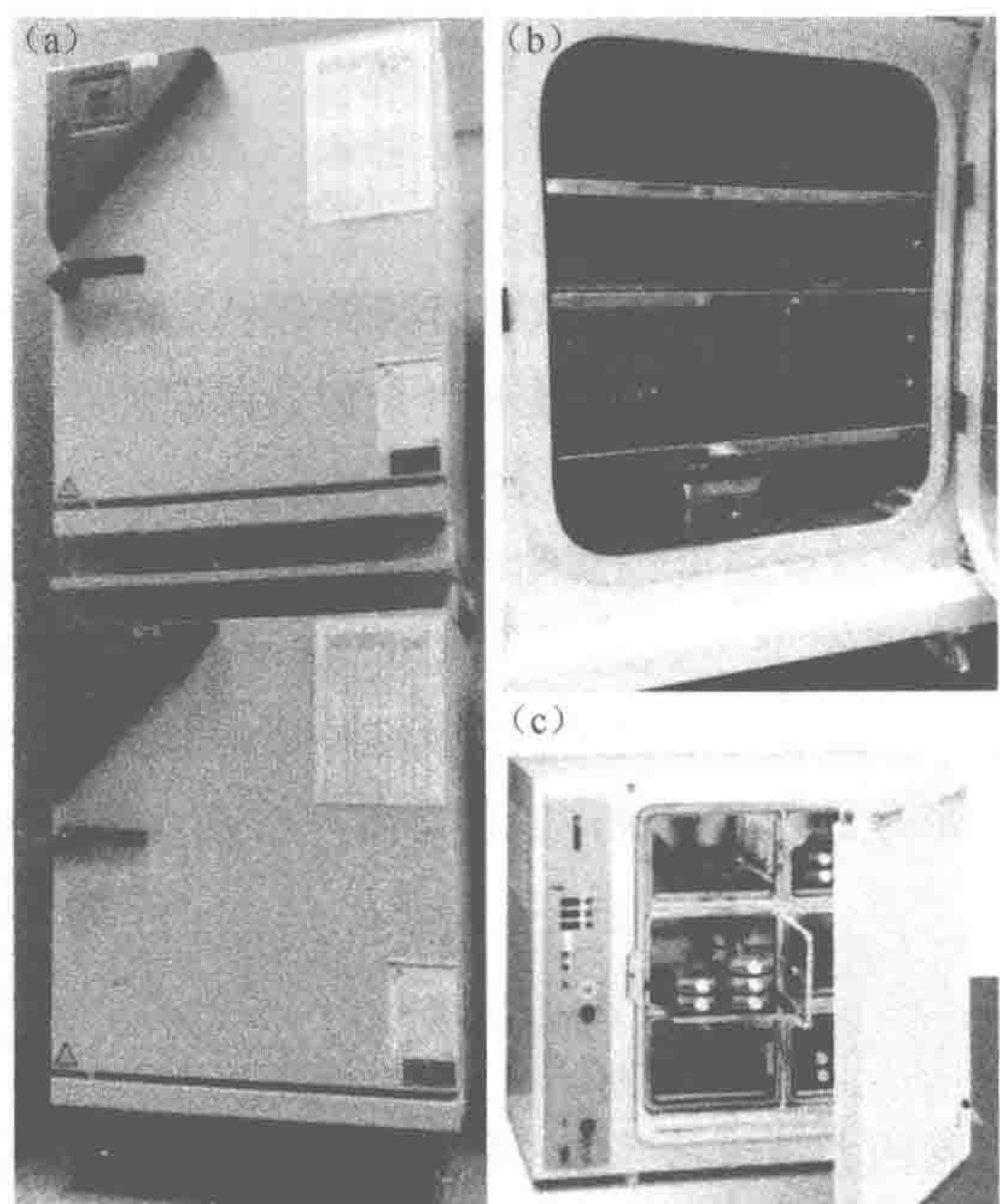


图 4.16 CO_2 培养箱实物图。(a) Binder 无风扇 CO_2 培养箱，相互堆叠放置以减少空间占用；(b) Binder CO_2 培养箱内部，呈现的有搁架、放置好的水托盘。内部光滑、易清洗，并带有不会刺穿不锈钢内表面的可移动滚架（由 Amanda Capes-Davis，澳大利亚 CellBank 儿童医学研究所提供）；(c) Heraeus Cytoperm CO_2 培养箱（由 Thermo Scientific 提供），其内设置的单独隔室主要用于打开培养箱时尽可能降低大气干扰（另见图 4.17）

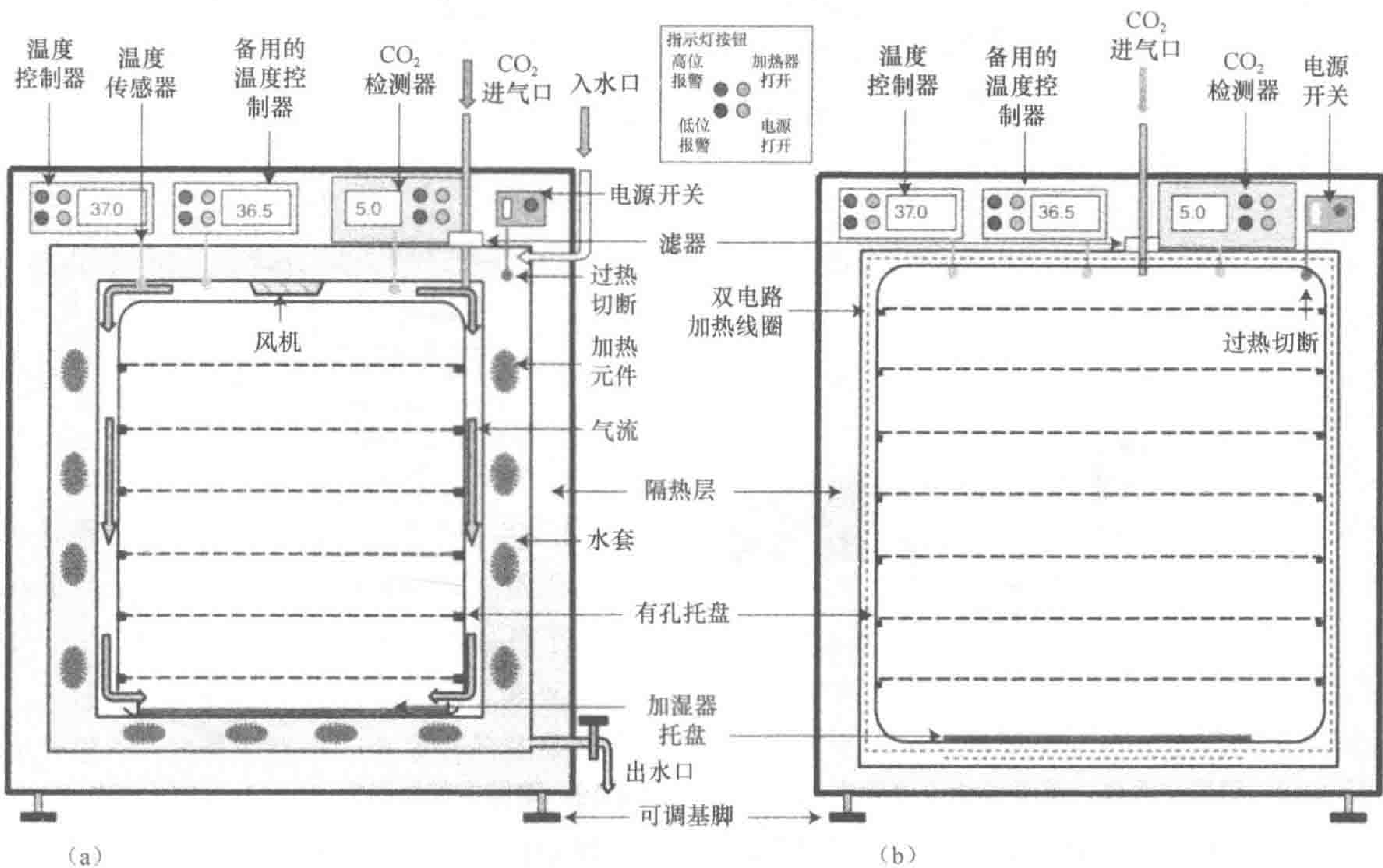


图 4.17 CO_2 培养箱设计图。两种类型的湿式 CO_2 培养箱控制面板正面图和隔室截面图：(a) 带循环风机的水套式 CO_2 培养箱；(b) 无循环鼓风机的干式 CO_2 培养箱（不指代任何具体的培养箱）

4.3.3 温度记录仪

一个范围在–70~200℃的便携式温度记录仪就能帮助你检测冷冻储存物品、细胞冻结速度、培养箱和灭菌烘箱的情况。每个温度记录仪都装有一个耐热温度计或带有一条长的有聚四氟乙烯涂层导线的电热偶。

应定期对烘箱、培养箱和温室就温度控制的均一性和稳定性进行检查，一个便携式温度记录仪可以作为一个内置记录器的控件。一些设备（如Omega OM-70系列）（图4.18）也可用来监测湿度和记录数据以便以后下载。温度记录仪应长期固定在温室、灭菌烘箱、高压蒸汽灭菌锅和冷冻储存容器内。应该坚持做带有日期的记录，以便做定期检查以防异常情况发生。

4.3.4 滚筒支架

滚筒支架常用在单层细胞的大规模培养上（参见21.2.2节和图21.12）。设备选择取决于培养规模（如待滚动瓶子的大小和数量），培养规模要根据需要的细胞量、细胞可达到的最大密度和培养瓶的表面积计算（参见表7.2）。小培养瓶的表面积最大，但是，考虑实验劳动强度大的问题，一个折中办法通常是使用直径约125mm（5in）、长度为150~500mm（6~20in）的培养瓶。培养瓶的长度决定了细胞最大产量，但受滚筒支架大小的限制；滚筒架高度决定了培养瓶的层数或排数。尽管买一个大滚筒支架比买几个小滚筒支架便宜，但后者更受欢迎，因为：①能让你一步步建立滚筒支架，并证实系统正常运行；②更容易放置在温室中；③如果一个滚筒支架需要维修时，不影响其他滚筒支架正常工作（另见21.2.2节）。目前，有专门用来容纳滚筒支架（图4.19）的培养箱可以利用。



图4.18 温度记录仪。用于监测温度的常用数字记录器（由Omega engineering提供）。有些温度记录仪还能监测湿度。相关数据可以被记录下来并通过USB下载到计算机中

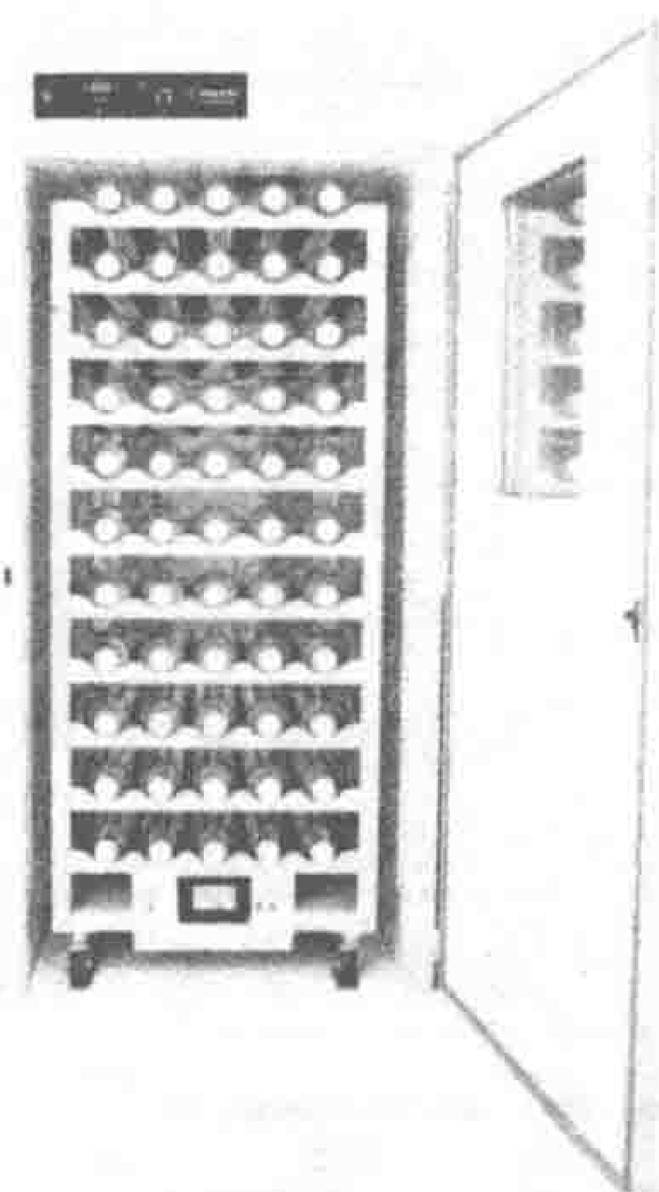


图4.19 滚筒支架培养箱。带有专用孵化器外壳的大容量滚瓶架（由Wheaton Scientific提供）

4.3.5 磁力搅拌器

使用任何搅拌器都可以快速搅拌溶解化学试剂，这或许得益于其中的一个内置电炉。但对于酶催化的组织解体（参见 11.3.3 节）或悬浮培养（参见 12.4.6 节，26.1 节），则需要注意以下几点：①马达不能让培养物发热（可用一个局部驱动旋转或一个外置马达驱动的皮带驱动系统）；②速度必须控制在 50r/min 以下；③低转速时，转子仍可搅拌体积达 10L 的液体；④这种装置能同时适合搅拌多种培养物；⑤每个搅拌器的位置都能独立控制；⑥每个搅拌器都能显示每分钟转数（r/min）的示值读数。总之，最好准备一个专用的磁力搅拌器用于细胞培养工作（图 4.20）。

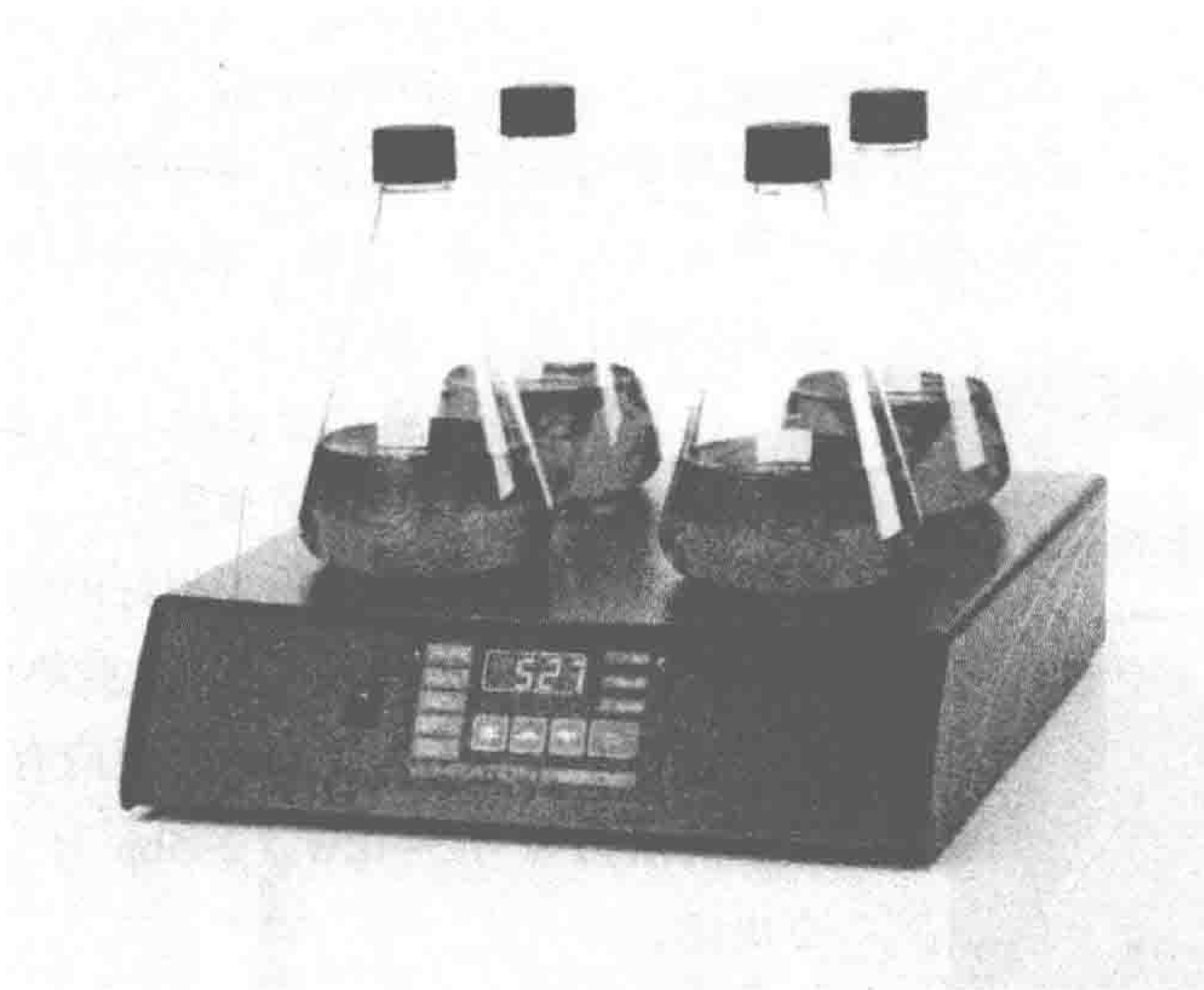


图 4.20 磁力搅拌器。四位 Biostir 磁力搅拌器，用于悬浮培养物或组织解离（由 Wheaton Scientific 提供）

4.3.6 培养器皿

培养器皿的选择取决于以下几个条件：①需要的细胞产量（细胞数）（参见 7.3.1 节，表 7.2）；②细胞是单层培养还是悬浮培养；③取样方式（同时取样还是间隔一定时间取样）（参见 23.8 节）。经常到商店转转常能获得更为廉价的产品，但不要频繁更换产品，在确定更换产品前，首先得检查一下供应商的产品是否能满足各种不同的需求（参见 10.6.3 节）。

注意，一定要标记清楚无菌、非灭菌、用于组织培养和用于非组织培养的塑料制品，将它们分开储存。如果能提供一个适合的洗涤和消毒设备，带有平坦侧面的方形玻璃瓶就可代替塑料培养瓶使用。然而，由于其视觉优势、无菌性、质量保证和使用方便等优点，塑料培养瓶比费用较低的玻璃培养瓶更受欢迎，因此，一次性塑料培养瓶几乎占了组织培养预算的 60%，甚至比血清费用还高。

培养皿虽然没有培养瓶价格高，但是前者易被污染且易使液体溅出。根据工作方式和环境无

菌情况，如果不是常规的细胞系传代，可以考虑在实验中使用培养皿。培养皿尤其适用于集落形成分析，因为该分析需要对培养皿中的集落进行染色、计数及在实验结束时对集落分离。

需要大量储存用于组织培养的塑料器皿。批量购买通常会使价格降下来，但必须要有一个足够大的储存空间，尤其是需要转瓶时。

4.4 准备和灭菌

4.4.1 洗涤

浸泡缸或水槽 浸泡缸或水槽应足够深，以便所有的玻璃器皿（除吸管和大瓶子外）在浸泡时能全部淹没于洗涤液中；但也不要过深，否则会因为玻璃器皿自身的重量而压碎底部的小器物。浸泡缸的尺寸以 400mm 宽（15in）×600mm 长（24in）×300mm 高（12in）为宜（参见图 3.7）。

玻璃器皿清洗机 或许清洗干净玻璃器皿最好的方法是找一个可靠人员做清洗工作。但玻璃器皿太多时，应考虑买一个自动清洗机（图 4.21）。目前，市场上有几款质量相当不错的清洗机，选购时请注意以下事项。

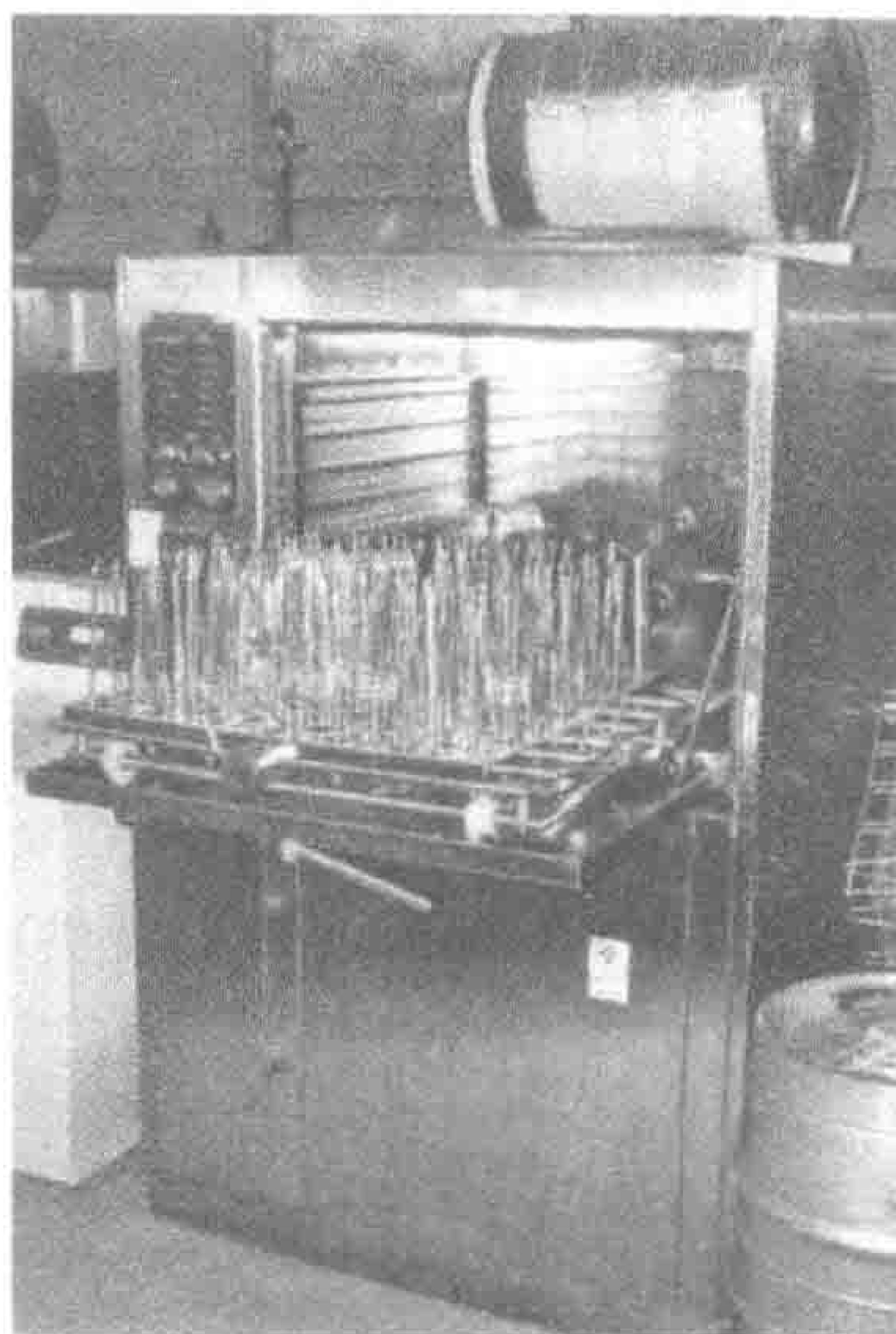


图 4.21 玻璃器皿清洗机。把玻璃器皿放到单个喷嘴上，以保证彻底洗涤和漂洗（Betterbuilt）（由 Beatson 研究所提供）

（1）选择带有独立套管的支架，这样的话，各种瓶子、培养瓶和其他金属器皿可放置其上。培养皿和烧杯等开放式器皿可通过转臂喷淋得到很好的清洗，但细颈器皿需单独喷洗。每个喷洗器底部应有硅胶垫保护瓶口，避免破碎。

（2）把水压进喷洗器的水泵应有一个高的输送压力，产生的压力为 1.5~4kW（2~5hp*），其具体大小由水泵大小决定。

（3）能将清洗水加热到最低 80℃。

（4）应安装一个在洗涤结束时，用于去离子水漂洗的设备。去离子水要加热到 50~60℃；否则，热洗和浸泡后的玻璃器皿会炸裂。漂洗应该连续冲洗，用过的水要弃掉，不能循环使用；如果必须循环使用，得至少用去离子水单独冲洗 3 次。

（5）前一个洗涤循环用过的漂洗水最好弃掉，不要再用于下一次洗涤，因为用机器清洗化学或放射性物品，以及细胞培养物时，弃去漂洗水可减少化学残留物。

（6）清洗机要与不锈钢设备连接，并用不锈钢或尼龙圈固定。

（7）如有可能，选用的玻璃器皿干燥机应该像清洗机那样能接纳同一套支架（图 4.14）。这样，无须卸载，即可通过同一个专用小车实现负荷在两者之间的直接转移。

吸管清洗器 可重复使用的玻璃吸管在一个普通的虹吸式清洗器中很容易清洗（参见 10.3.2

* hp＝hight pressure（高压）。

节，图 10.5）。清洗器要放在地面上而不是桌上，这样方便吸管的取放；清洗器还应与去离子水供应系统和常规的冷水供应系统相连，方便最后用去离子水冲洗。如果可能，去离子水供应管也要安装一个简易的转换阀（参见图 3.7）。

吸管干燥器 如果清洗器中有一个不锈钢篮，那么吸管可以在清洗后直接转移到电干燥器中，也可以把移液管放在支架上或普通烘箱中干燥。

干燥烘箱 这种干燥箱的特点是容量大、风扇驱动、温度能达到 100℃。实际上，消毒箱（参见 4.4.3 节）兼扮干燥箱的角色。还需要一个温度范围为–50~60℃的干燥烘箱用于干燥可重复使用的塑料器皿，如聚丙烯和聚苯乙烯。而聚碳酸酯一般能耐受更高的干燥温度。

4.4.2 培养基和试剂的制备

水净化器 玻璃器皿的漂洗、粉状培养基的溶解、浓缩溶液的稀释都需要纯化水。用去离子水或反渗水冲洗玻璃器皿已经足够了，而培养基和稀释溶液的配制需要用超纯水（UPW），超纯水需要经 3~4 个步骤才能制备出来（图 4.15，另见图 10.9）。重要的一点是，每一步产生的水质不同，反渗之后接着是碳过滤、去离子化和微孔过滤（通过除菌滤器，参见图 10.11），蒸馏（带有硅胶套元件，参见图 10.11）也可代替第一步。若你支付了燃料费用，反渗一步相对便宜；若没有支付这笔费用，蒸馏更可取，更有可能获得无菌水。如果使用反渗，选择的滤芯要适应供水系统的 pH，因为有些膜在极端 pH 条件下会形成穿孔（向供应商咨询）（图 4.22）。

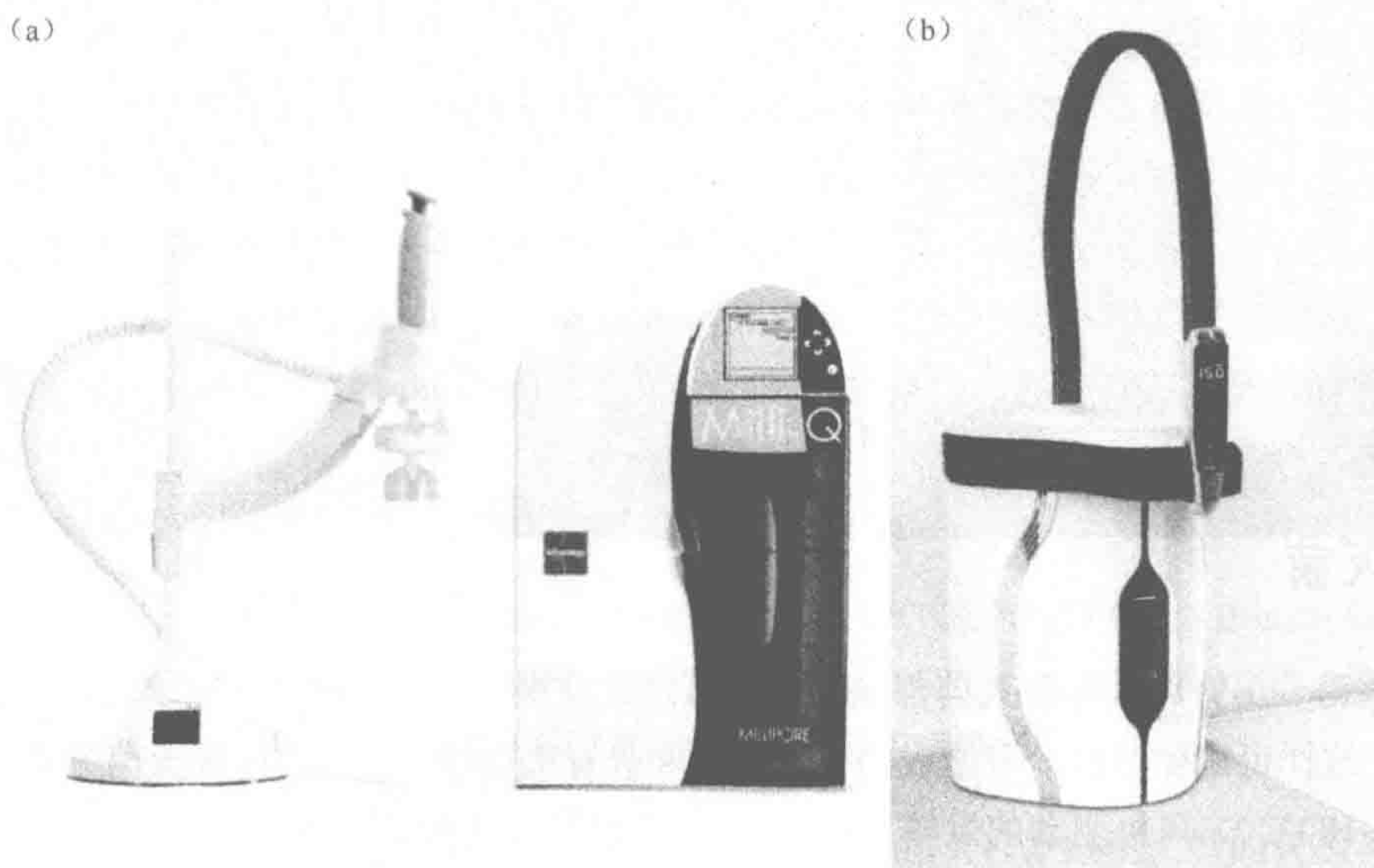


图 4.22 水净化器。用于制备培养基及组织培养相关试剂的 I 级超纯水由两类水净化器系统生产：(a) Millipore Milli-Q（由 Merck-Millipore）；（b）Elga Purelab Chorus 1（由 Elga-Veolia 提供）。两种水净化系统还有附加设备生产 II 级和 III 级纯水，用于漂洗或向高压蒸汽灭菌锅供水，也可以作为生产 I 级超纯水的供应原料

去离子器应装一个用来监测出水的电导仪，指示何时需更换滤芯，其他滤芯应根据厂家说明书注明日期按时更换。另外，可用总有机碳（TOC）分析仪监控胶体物质。

纯水一般不要储存，但可通过相关设备继续再循环以尽可能降低藻类污染。系统中任何管子或储水器都要定期进行藻类检查（每隔3个月左右检查一次），用次氯酸盐和去污剂（如Chlorox或Chloros）清洗，下次使用前再用纯水彻底冲洗。

水是所有培养基的试剂，特别是不含血清培养基中最简单但最重要的成分（参见第9章）。高质量的质控检测是定期检查敏感细胞系在含水培养基中的接种率（参见10.6.3节，方案23.10）。

天平 尽管多数实验室用的是制备好的培养基，但一些试剂有必要实验室自行配制。为此，实验室根据称量的规模，需要准备一个称量范围在10mg~100g，甚至达1kg的天平（能自动去皮重的电子天平）。如果你是一个试剂供应商，常常需要准备大批量的，有时是浓缩10倍的浓缩液，这时需要称重的试剂量很大。事实表明，最经济的办法是购买两台天平，一台普通天平、一台精密天平，因为这样可能不用多花钱，而且使用方便、称量精确。

热板磁力搅拌器 悬浮培养和胰酶解离组织时，一般用常温搅拌器；若要加快一些试剂的溶解，最好是用热板磁力搅拌器。在温室中，将溶液放在搅拌器上搅拌即可，但是若37℃条件下搅拌时间过长会引起微生物的滋生，所以稳定性好的溶液最好在稍高温度下进行短时搅拌。

pH计 制备培养基和特殊试剂时要求有一个简易pH计。对多数溶液来说，用酚红指示剂检测pH已足够用了，然而，当不能使用酚红时（如在培养细胞的荧光分析，或者酚红产生干扰的雌激素结合实验中），在制备培养基和试剂过程中母液制备及常规质量检测时则需要使用pH计。

电导仪 实验室中制备溶液时，必须进行质控检测以防错误发生（参见10.6.1节）。用电导仪就能对离子浓度进行简单检测，然后与一个已知的标准品（如正常盐溶液，0.15mol/L）比较，以判定溶液是否达到要求。

渗透压计 渗透压是培养基最重要且很难检测的物理性质之一。虽然带电分子的浓度能影响导电性，但是不带电颗粒也会影响渗透压。因此，渗透压计（参见图8.3）是制备溶液时校对新配方或为培养基补充添加试剂的一个十分有用的辅助检测设备，也可以作为质控的第二道防线。渗透压计一般通过降低培养基冷凝点和提高蒸汽压力进行工作，常选择小剂量（≤1mL）样品进行测量，因为对贵重或稀少的试剂来说，其准确度（±10mOsmol/kg）可能还没有试剂的价格或稀有性重要。

4.4.3 灭菌

灭菌烘箱 尽管绝大多数灭菌都能在高压蒸汽灭菌锅中进行，但对于玻璃器皿，最好是干热方式灭菌，这样可避免蒸汽冷凝造成的化学污染和吸管头腐蚀。然而，这种灭菌方式需要用温度高的（160~180℃）、风机驱动的烘箱（如Binder FD或松下MOV系列），可以保证对所有负载均匀加热（另见10.3.1节）。因为有了高压蒸汽灭菌锅，就不用购买那种相对玻璃器皿数量和大小容积太大的烘箱。用两个小烘箱好于用一个大烘箱，当玻璃器皿用量少时，小烘箱加热更容易、更均匀、更快速、更经济。出故障时实验人员也可以得到更好的保护。

蒸汽灭菌器（高压蒸汽灭菌锅） 最简单、最便宜的灭菌器就是家用压力锅。它能产生100kPa（1atm，15lb*/in^2）的压力。台式高压蒸汽灭菌锅能自动编程和安全锁定（图4.16）。独立式高压蒸汽

---

* lb，磅，1lb≈0.4536kg。

灭菌锅带有可编程定时器，可进行灭菌前、后排气选择，并能记录温度等功能，它的容积更大，操作灵活（图 4.17），有助于实验室工作（GLP）顺利进行。根据当地的生物安全管理条例，或许会要求实验人员对组织培养实验室产生的废物进行高压蒸汽灭菌，这样的话要考虑是否还需要再增加一个灭菌器（图 4.23）。

在灭菌前后，锅内未排气情况下就可以完成一个湿循环（水、盐溶液等）。干燥的物品（如仪器、棉签、螺旋盖等）在灭菌前就需要排气或者向下排气进行换气，以便于热蒸汽有效进入。灭菌后，灭菌锅内也应排气放掉蒸汽，利于干燥，否则物品将会受潮，并在干燥过程中留下污痕。一般向高压蒸汽灭菌锅供应的是去离子水或反渗水，尤其是在无法进行排气后循环时。如果你的灭菌量大（>300L，9ft^3），那就选择买两个中型灭菌锅，便于在正常维修和发生故障时仍有一个正常运转的灭菌锅以供使用。而且，中型灭菌器加热和冷却速度非常快，对小装量来说更为经济。灭菌锅周围要为维修和通风留有足够空间，并有完备的排气装置，以利排热、排蒸汽和排冷凝水。

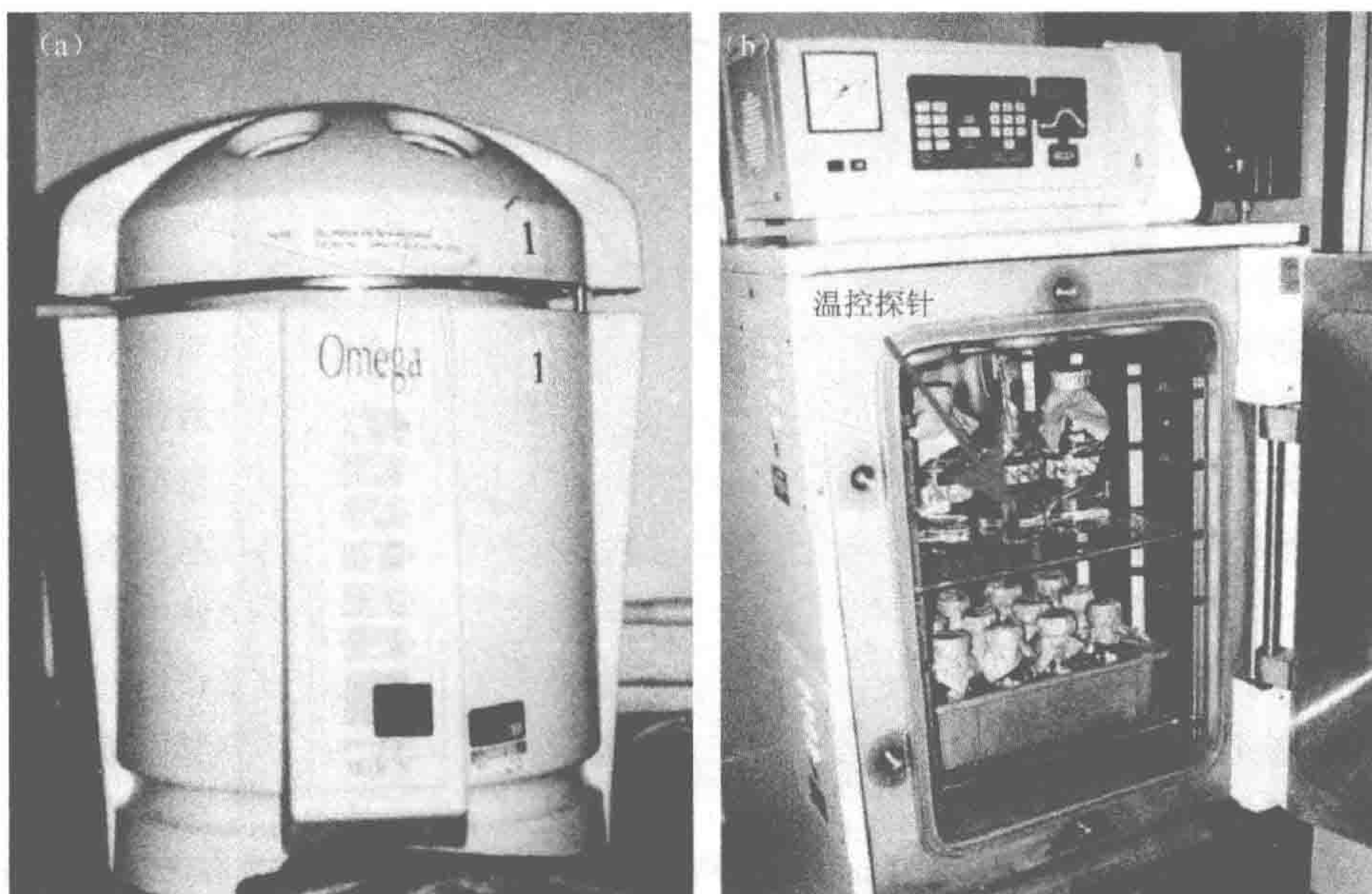


图 4.23 高压蒸汽灭菌锅。（a）Prestige Medical 制造的小型顶开式高压蒸汽灭菌锅（由 Beatson 研究所提供）；（b）中型（300L，10ft^3）实验室高压蒸汽灭菌器，具有最大载荷量的方形室。顶部控制台上的记录器与载荷中心瓶内的检测器相连（由 Beatson 研究所提供）

大多数小型灭菌器要与自己的蒸汽发生器（加热器）一起工作，但稍大型的灭菌器都自带一个蒸汽发生器，一个单独的蒸汽发生器，或者使用蒸汽管线输送蒸汽的设备。如果高压蒸汽可由网络管道输送，那么这将是给高压蒸汽灭菌锅加热加压的最简单、最低廉的方法；若没有，那么最好的办法是买一个内装蒸汽发生器的灭菌器。这样的灭菌器安装更便宜，移动更方便。但如果只能选择大型灭菌器时，由于它通常只配有一个单独的蒸汽发生器，在这种情况下，在实验室设计之初就要为蒸汽发生器预留一定的空间。

除菌滤器 可重复使用设备需要过滤除菌，滤器大小根据实验操作的规模而定。若容积在

10L 以上的，通过正压实现过滤，这要求压力容器上游连一个泵。而小容积依靠一个小储液槽和下游蠕动泵就能完成过滤除菌（参见图 10.12）。现在，大多数实验室使用的是一次性过滤器，这些过滤器大小不等，包括从 25mm 的注射器适配器，至 47mm 瓶口适配器，再到过滤培养瓶等各种类型（参见 10.5.2 节）。另外，手头保留几个稍大的滤器也是明智之举。

4.5 储 存

4.5.1 耗材

大量的培养器皿（参见 7.3 节）、离心管（图 4.24）和其他耗材（表 4.3）可以存放在靠近生物安全柜的相邻工作台上方的隔板或手推车上。需要留一定的隔板空间用来存放 PBS 和水等稳定性液体试剂。

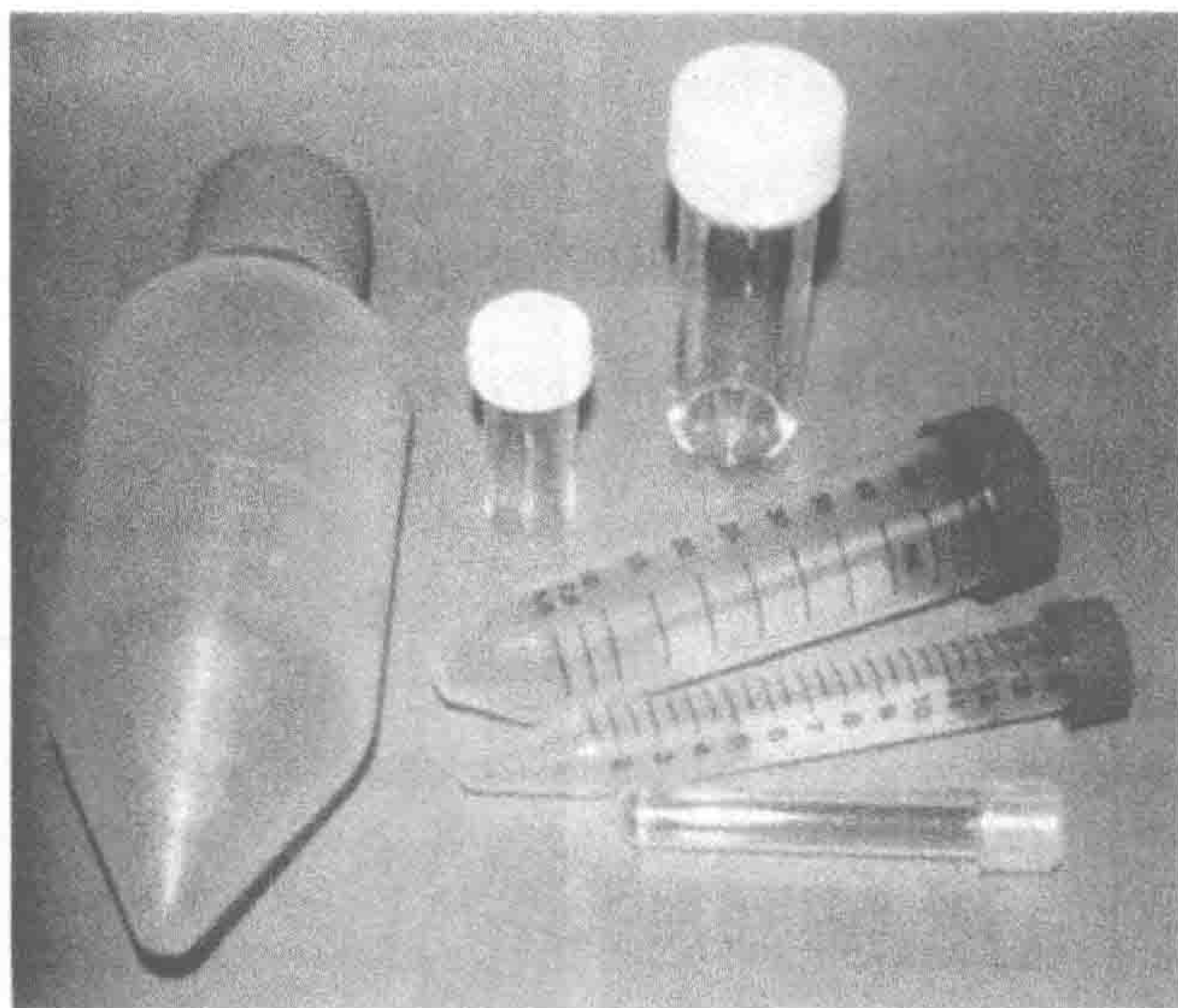


图 4.24 管子。离心管和样品管，灭菌使用，非组织培养级别，但可作组织培养级离心管用（BD Biosciences; Corning）。从左边顺时针方向依次为：250mL 离心管（Corning）；5mL Bijou 瓶（Sterilin）、30mL 通用容器（Sterilin）、50mL 离心管（BD Biosciences）、15mL 离心管（BD Biosciences）和 5mL 样品管（BD Biosciences）

4.5.2 冰箱和冷冻箱

通常，家用冰箱或冷冻箱就十分有效，也比专用的实验室设备便宜。若没有冷冻箱，家用冰箱也很有效（冰箱储藏室），应把冷冻室的空间留得大一些，以减少除霜次数。然而，如果需要 400L（$12ft^3$）或更大的储存空间，大医院、血库或供应餐饮的冷冻箱比较好。

如果有足够空间，且做组织培养的人在三四个以上，就需要考虑建一个冷藏间，就空间而言比单独买几个冷冻箱更经济，而且更容易进入，方便存取。冷藏间的墙壁要光滑，以便清洗；架子要有脚轮，便于移动，方便清洗；冷藏间要定期清理，清除旧的库存；墙壁和隔板要用洗涤剂

消毒，以减少真菌污染。

类似的建议也适用于冷冻箱。几种家用冷冻箱不仅便宜，而且效果也与实验室专用冷冻箱一样。大多数组织培养相关试剂放在–20℃就足够了，不需要超低温冷冻，同时也不推荐建超低温室，因为清洗起来十分困难、繁杂，大面积维修时，在搬运里面的物品时会出现许多严重问题。

自动除霜冷冻箱不适合酶、抗生素等试剂的保存，但对大多组织培养用试剂来说，自动除霜冷冻箱非常有用，因为它们的体积能阻止大的温度波动，其属性不易受严重的低温损伤的影响。不难想象，自动除霜冷冻箱的温度在不断变化，会造成血清变质，但实际上这种事不可能发生，因为血清中的许多必需成分是小分子蛋白质、多肽及简单的有机物和无机物，这些成分不易受低温伤害的影响，存放溶液的体积大于 100mL 时更是如此。

4.5.3 冻存容器

在第 19 章会详细描述冻存容器的详细情况，并会给出有关选择上的参考建议（另见 15.3.6 节）。总体上，大多数实验室会选择液氮冷冻箱，其选择主要取决于储存物品的大小和类型。对小型实验室来说，一台容量为 35L 的带储存罐（参见图 15.5a，图 15.6a）或抽屉式搁架（参见图 15.5d，图 15.6c），可容纳 500~1000 个安瓿瓶（参见附录Ⅱ：冷藏器、液氮）的冷冻箱就足够了。稍大的液氮冷冻箱能容纳＞10 000 个的安瓿瓶，并带有液氮灌注壁，这样可减少液氮损耗，即使储存室内无任何液氮也能提供安全的储存环境。选用带液氮灌注壁的冷冻箱时，重要的一点是必须采取一定的预防措施确保无颗粒性物质、水或水蒸气进入灌流系统，因为灌注系统一旦被阻塞就很难甚至根本无法清理。最好购买几台小型冷冻箱，因为将物品分散储存在多个冷冻箱中，会降低其中一个发生故障带来的危险。

还应购置一台合适的储存容器作为供应液氮的备用装置，容器的大小取决于：①冷冻箱的大小；②供应液氮的频率和安全性；③液氮蒸发率。一台容量为 35L、每周使用 5~10L 液氮的窄颈冷冻箱仅能放置一个 25L 的杜瓦瓶，定期供应即可。较大的冷冻箱最好用专用的储存罐通过管道直接输送液氮。例如，一个安装自动装满报警系统的 320L 液氮冷冻箱要配备一个 160L 的液氮储存罐，更大的冷冻箱或者几个小型冷冻箱要配备一个 500L 的液氮储存罐（3.2.7 节，图 3.8）。一般来说，在组织培养室中 1~2 个液氮冷冻箱可以与储存杜瓦瓶放在一起，但如果冷冻箱的数量或体积增加，最好是将它们放置在一个专门的储藏区中。但是，若对冷冻箱做不到日常观察和监督，就需要安装一个可靠的报警系统和定期检查程序。所谓“眼不见，心不烦”虽然很老掉牙，但确实是这样。

4.5.4 程序降温仪

尽管可以通过将细胞放到隔热盒中置于–70℃中这种简单的方法冻存细胞，但一些细胞需要不同的降温速度或复杂的预调降温曲线（参见 15.3.4 节），为此，可编程冷冻箱（如 Cyromed、Planer）能在预设程序指导下，通过控制液氮向冷冻室的加注速度从而改变降温速率（参见

图 15.4)，控制细胞冷冻过程中降温速度的更便宜的选择包括特制的冷冻盒（Mr Frosty，Thermo-Nunc；Cool-Cell，Bioscision)、一个用来包裹容器的简易的聚苯乙烯泡沫塑料，或者用于水管的泡沫保温材料（参见图 15.2~图 15.4)。

4.6 实验室辅助设备

4.6.1 计算机和网络

尽管很多人喜欢用记录本进行手动记录或者随后键入计算机上，但最好将细胞系维持（参见 12.5.8 节)、原代培养（参见 11.3.11 节）及实验的记录情况随时输入到放置在组织培养室的联网笔记本电脑或平板电脑中，这样便于以后的检索和分析处理。细胞系相关信息最好存入计算机数据库中，同时计算机也可以用来对液氮冷冻箱进行库存管理（参见 15.4.1 节)，并对进出实验室的物品进行记录。对于大型实验室来说，塑料器皿、试剂及培养基等物品的库存管理也会被大大简化。计算机网络化有相当大的优势，因为个人计算机上的资料能够被定期集中备份，某个时间输入到计算机上的信息可以在其他计算机上检索到。例如，组织培养室中拍摄的数码图片能保存在中央服务器上，可以在办公室或资料区的计算机里，甚至在异地都可以检索到。

4.6.2 正置显微镜

除倒置显微镜外，还需要有一台普通正置荧光显微镜用于染色体分析、支原体检测和放射自显影。一个高级研究型正置显微镜要配一个 100 倍放大的普通明场光学系统，相差显微镜要配一个 40 倍的物镜，最好是 100 倍的相差物镜；荧光显微镜要配一个落射式照明系统及 40 倍、100 倍物镜用于荧光法检测支原体（参见方案 14.1）及荧光抗体观察。一个 50 倍的水浸物镜（如 Leica）尤其适用于 Hoechst 染色的常规支原体湿制剂的观察，还应安装一台数码或 CCD 照相机用于稳定性制剂的照相记录，此类照相机许多显微镜制造商和独立供应商都有出售。

4.6.3 低温冷冻箱

大多数组织培养试剂应保存在 4℃或-20℃。但在特殊情况下，如一些药品、试剂或组织培养物要求在-90~ -80℃条件下保存。此条件下绝大多数水已经结冰，很多化学和放射反应就会受到严格限制。-90~ -80℃冷冻箱也可用于隔热容器中细胞的冷冻（参见方案 15.1)。卧式冷冻箱能用最低的耗电量有效保持低温环境。但立式冷冻箱更省地面空间，且存取方便。如果你一定要选立式冷冻箱，必须要求它有几个单独的带有紧贴门的隔室，如 400L（15ft^3）的冷冻箱要有 6~8 个隔室。但购买立式冷冻箱的费用比卧式冷冻箱至少贵 20%。

低温冷冻箱产生大量的热，只有把这些热量排出，才能保证低温冷冻箱有效工作（否则根本

不能工作），因此要把这样的冷冻箱放在通风良好的房间内或者有空调的地方，使环境温度不超过 23℃。如果做不到这一点，有必要购买一台专门为热带地区设计的冷冻箱，否则的话将会面临需不断维修和缩短冷冻箱工作寿命等问题，而且还得为储存其内的贵重物品操心。如果冷冻箱出现需花 1000 美元以上修理费的故障，再加上由此造成的材料损失，不久就会花掉购买廉价冷冻箱所省下的费用。

4.6.4 共聚焦显微镜

实现荧光标记细胞的细胞学研究主要得益于共聚焦显微镜观察方法的改进（参见 18.4.7 节）。这项技术能使显微镜看到“光学切片”样品在焦平面上的成像情况，同时避免了来自不同焦平面上的相邻细胞或细胞器的干扰。数字化储存信息并用各种方法分析处理，如对样品做纵剖切片（所谓的“Z-切”），尤其在进行滤孔或椭球体等三维培养观察时很有用。

4.6.5 PCR 热循环仪

很多用于细胞系鉴定的辅助性技术，如支原体检测（参见方案 14.2）、DNA 扩增（参见方案 13.1）均依靠 DNA 特异性片段的扩增和检测。若你打算用这些技术手段，则需要用热循环仪进行聚合酶链反应。

4.7 专用设备

4.7.1 显微注射装置

显微操纵仪可用来对细胞直接注射，如可用于核移植和染料注射等（图 4.11b）。

4.7.2 菌落计数器

单层菌落用记号笔标记后便可用肉眼或借助解剖显微镜进行计数，然而，如果要计数多个培养板上的集落数，就需要用到自动计数器。最简单的自动计数器使用的是电极记号笔，每触到一个克隆就自动计数，自带的放大镜头可帮助发现集落。而可编程电子计数器的精密度更高，但购买费用也大幅度增加，它能利用图像分析软件对细胞进行计数。这些计数器速度非常快，能够辨别不同直径细胞群落，甚至能把毗邻的集落区分开（参见 23.10.2 节）。

4.7.3 离心式淘洗器

离心式淘洗器是专门用于分离大小不同的细胞的一种离心机（可见 17.2.2 节），这种设备昂贵，但效率非常高，尤其对于高产量细胞来说。

4.7.4 流式细胞仪

这种仪器能依据多种参数对细胞群进行分析，包括前向和后向光散射、吸光度和荧光（参见17.3.2节、23.7.2节）等。多参数分析结果能以二维或三维形式展示，常把这类分析模式的仪器称为流式细胞仪（参见23.7.2节，如BD Bioscience Cytostar），但是，它们产生的信号也能被用在荧光激活细胞分选（FACS）上，以高分辨率分离细胞群落（如BD Bioscience FACStar）。仪器的价格很高（10万~20万美元），若想获得可靠的结果，最好雇一个有经验的操作人员。也有用价格不太贵的台式分析仪器（Guava，Accuri）来测定细胞数量和各种荧光参数的（参见23.1.4节）。

参考文献

Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008). The impact of O_2 availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**:967–975.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* **141**:872–883.

（徐存拴 译）

第5章

无菌技术

细胞培养已经发展成了一项大型的多元化技术，并广泛应用于基础研究、诊断学、再生医学和生物技术等领域。在面对细胞培养和细胞系培养的问题时，它虽然在一些专用技术上有所不同，但许多基本过程都是共用的。通用的操作步骤只有在一定程度上标准化，获得的结果才能在不同的地点和时间重现。风险必须要明确，并给出适合的应对危险的方法。为此，现在已经颁布了各种针对性的操作指南（Coecke et al.，2005；Balls et al.，2006；Geraghty et al.，2014）。使用良好实验室规范（GLP）与良好操作规范（GMP）对此类推，这些原则就成了所谓的良好细胞培养规范（GCCP）。本书的几个章节都是为了达到这样的一个目的。GLP 和 GMP 将在第 6 章详细讨论。

本书中有 8 个主题与 GCCP 关系尤其密切：

（1）无菌技术（本章）

（2）安全和生物伦理（第 6 章）

（3）细胞系的保持（第 12 章）

（4）验证和表征（第 13、18 章）

（5）污染（第 14 章）

（6）细胞系的储存和分配（第 15 章）

（7）质量保证（参见 10.6 节、12.5.6 节、13.1 节、13.3 节、19.1 节和 23.9.2 节）

（8）保持记录（参见 10.6 节、11.3.1 节、12.5.8 节、13.2 节）

其中，第一个是无菌技术，这是其他所有技术开展的基础。

5.1 无菌技术的目的

5.1.1 污染风险

微生物污染一直是组织培养中的一个主要问题。细菌、支原体、酵母菌和真菌孢子可能通过操作者、空气、工作台面、溶液及其他途径被引入进来（参见 14.1 节，表 14.1）。无菌技术的目的就是通过制定一个严格的操作规范并确保每个人在使用设备时都要遵守，从而排除这些污染。

污染可以被局限在一两种培养物中，也可以在几种培养物中散布，影响整个实验；或者可能广泛传播，进而殃及自己（甚至整个实验室）的全部实验物品。以下方法会最大限度地降低污染

带来的危害：①培养物在每次处理时都要用肉眼和显微镜（最好用相差显微镜）进行仔细检查；②培养物至少要在无抗生素培养基中生长一段时间，以发现隐藏的污染（参见 12.4.8 节）；③使用前，使用者自己或者由供应商对试剂进行无菌检查；④瓶装培养基或其他试剂等不要与他人共用，也不要用于不同的细胞系；⑤任何时候都要保持高标准的无菌技术。

支原体感染在普通显微镜下是看不见的，但它是造成污染的主要威胁之一。支原体在未被发现的情况下就能传染给实验室中其他培养物。因此必须建立一种肉眼可见的支原体检验方法，特别是细胞生长出现异常时（参见 14.3.2 节）。

5.1.2 维持无菌状态

正确的无菌技术应该在培养物外部环境的微生物与培养瓶或培养皿内干净无污染的培养物之间建立起一道屏障。因此，所有与培养物直接接触的物品必须无菌，操作方案必须按培养物和其非无菌环境之间不能有直接联系来设计。现已经认识到，如果不彻底改变常规的操作方法，就不可能有绝对的无菌屏障。因为检查个人预防措施是否合适是件旷日持久的工作，采用的方法在很大程度上又以一般性常识和经验为基础。无菌技术是用来减小感染可能性的各种措施的一个有序组合，其中一步的遗漏与后来发生的污染之间并不总是有绝对的相关性。在污染可能发生的概率增加之前，操作者或许已经疏忽了几项预防措施（图 5.1）。污染发生的原因通常是多方面的，

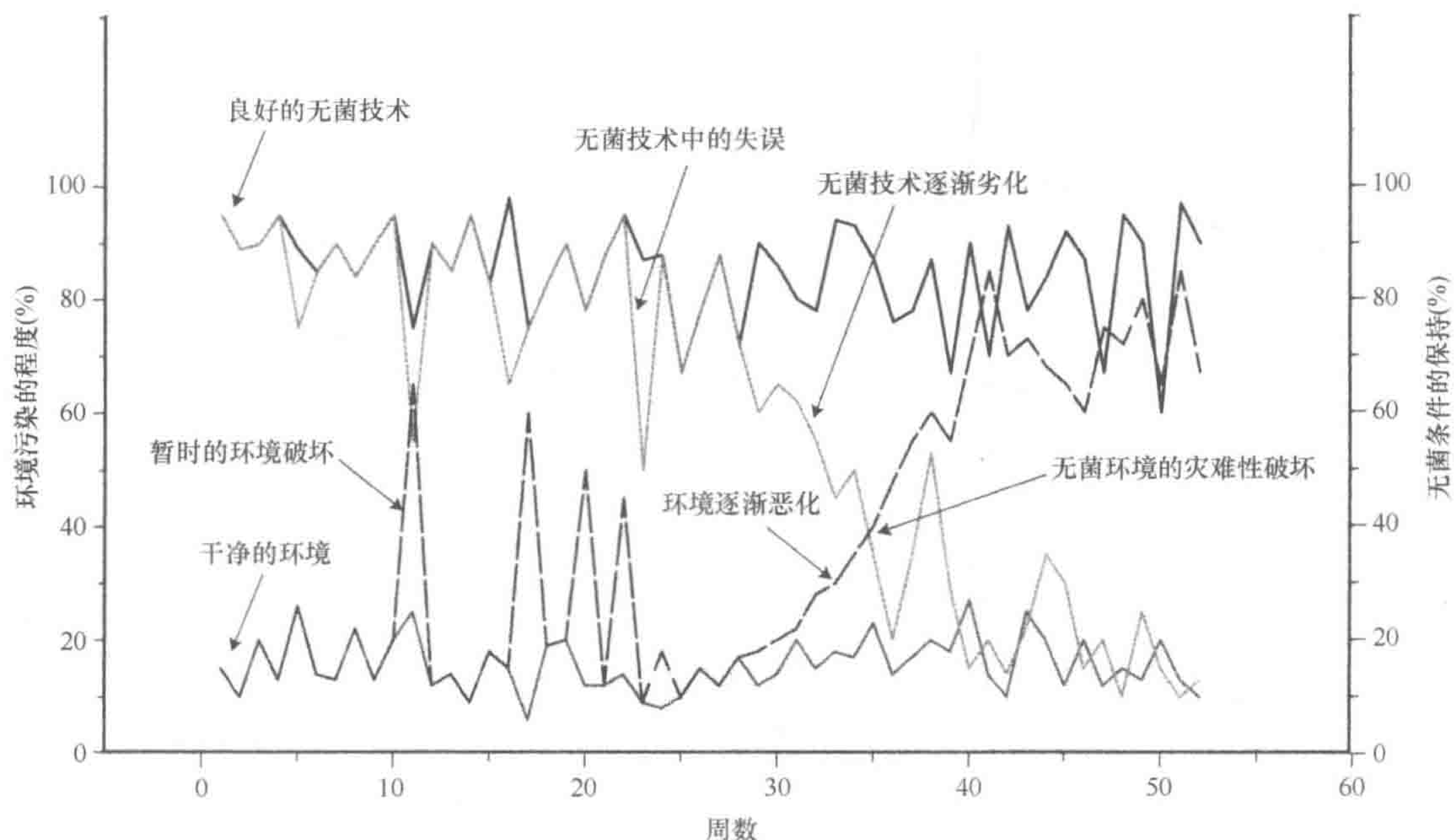


图 5.1 污染的概率。图中上方实线代表以百分比表示的技术变化，设定无菌技术为 100%时最好（右侧坐标轴），它代表的是理想的无菌技术；图中底部实线代表环境污染的起落变化，用“0”表示完全无菌（左侧坐标轴）；这两条线都有波动，顶部线表示技术失误（如忘了擦工作台面、移液器握得太低而近于管的中段、移液器接触了非无菌面等）；底部线表示环境污染情况（如孢子量多、培养箱被污染、试剂被污染等），只要这些失误和污染情况在严重程度及持续时间上最低，这两条曲线就不会重叠。当严重的技术失误（点线）和环境污染（虚线，如第 10~11 周）恰好同时发生时，污染的概率就会升高。如果技术失误进一步增加（点线，第 28~36 周）和环境进一步恶化（虚线，第 25~42 周），以致两条线交叉时，感染的可能性就很大，常导致多方面、多因素的污染

找不出一个简单明确的解决办法。预防措施一旦确定，就要一直坚持下去，这样就会极少出现污染，即使发生也会容易检测到。

虽然实验室条件在某些方面已有改善（如空调、过滤和层流设备等），但中型实验室往往比较拥挤，设备可能需要共享。如果能严格遵守合理的预防措施，无菌环境也不难维持。但必须要求仪器使用者严格遵守操作规范，此外要有正确的质控检测方法，同时设备检测一定要到位（参见6.10节）。

5.2 无菌环境的基本要素

由于抗生素、层流柜、过滤空调机的引入，这些年来，给细胞培养创造洁净区的条件已有很大改善（图5.2）。由于洁净的室内空气加上层流的使用创造出了更简单、更可靠的无菌环境，故没必要持续使用抗生素，而且此法也不可取。

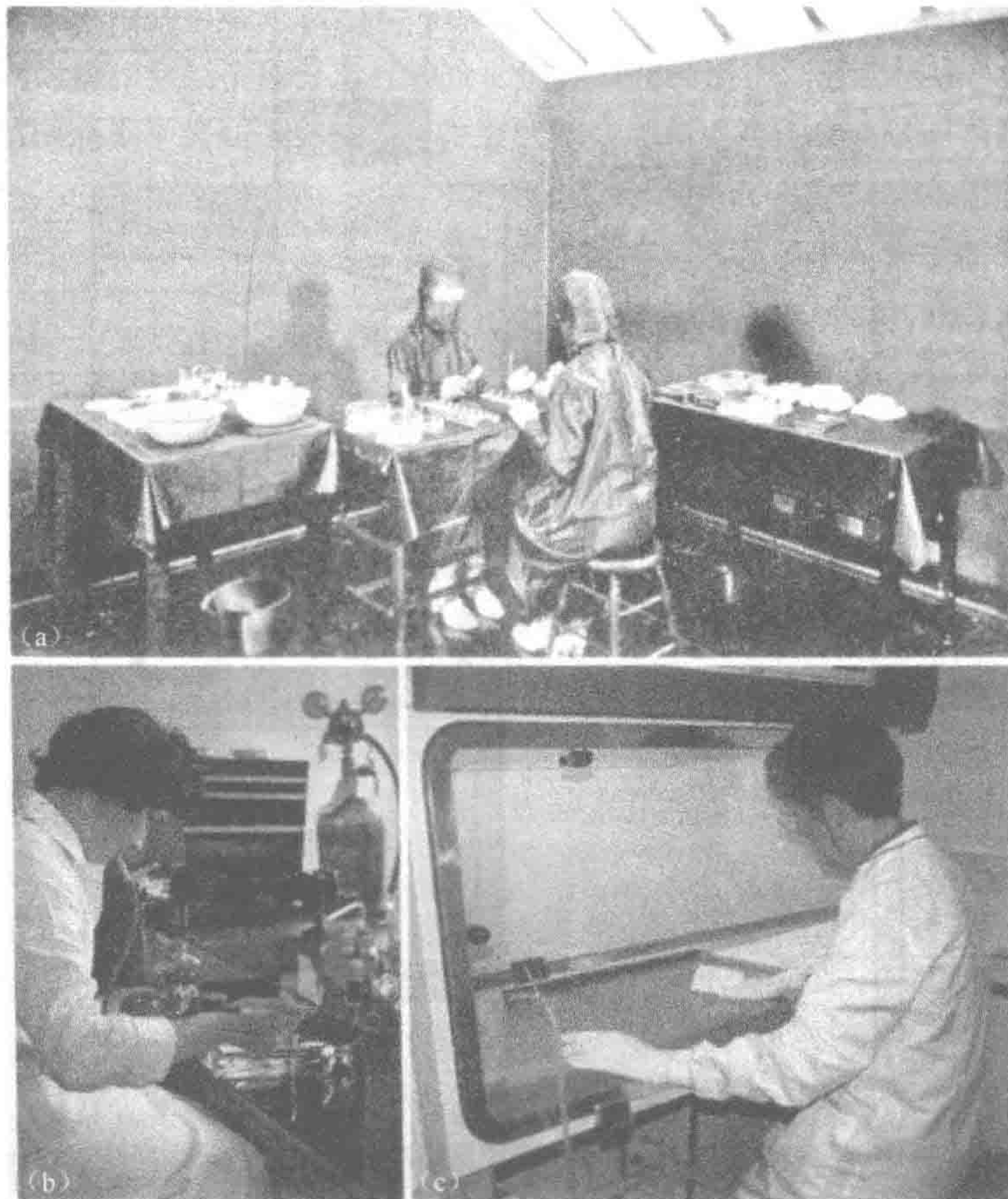


图5.2 组织培养工作区。这些图片展示的是这些年来组织培养区的布局是如何变化的。(a) 20世纪30年代Rockefeller研究所其中的一个Alexis Carrel培养室（来自Parker，1938）；(b) 1961年格拉斯哥大学生化系John Paul组织培养室中所使用的带有玻璃罩的桌子；(c) 1996年格拉斯哥大学Beatson研究所使用的生物安全柜

5.2.1 层流

在层流柜内工作的主要优点是：持续、稳定的过滤气流通过工作台面，使工作空间免受灰尘和污染（图 5.3）。层流方式主要有两种：①水平式，气流从操作者对面一侧吹出，与工作面平行，并且不进行再循环（图 5.3a）；②垂直式，气流从层流罩顶部向下吹到工作台面上，并被吸到工作台面下，最后，像生物安全柜一样，要么再循环，要么排出（图 5.3b）。大多数柜内的气体，70%气体参与再循环，30%气体被排出并通过吸入工作台面上方空气进行弥补。这种构造设计目的是尽量减少空气从安全柜内工作区溢出。水平式层流罩提供的气流最稳定，为培养物和试剂提供了最好的无菌保护；垂直层流罩则给操作者以更多保护，尤其是使用归类Ⅱ级 BSC 的层流罩时（图 6.5）。

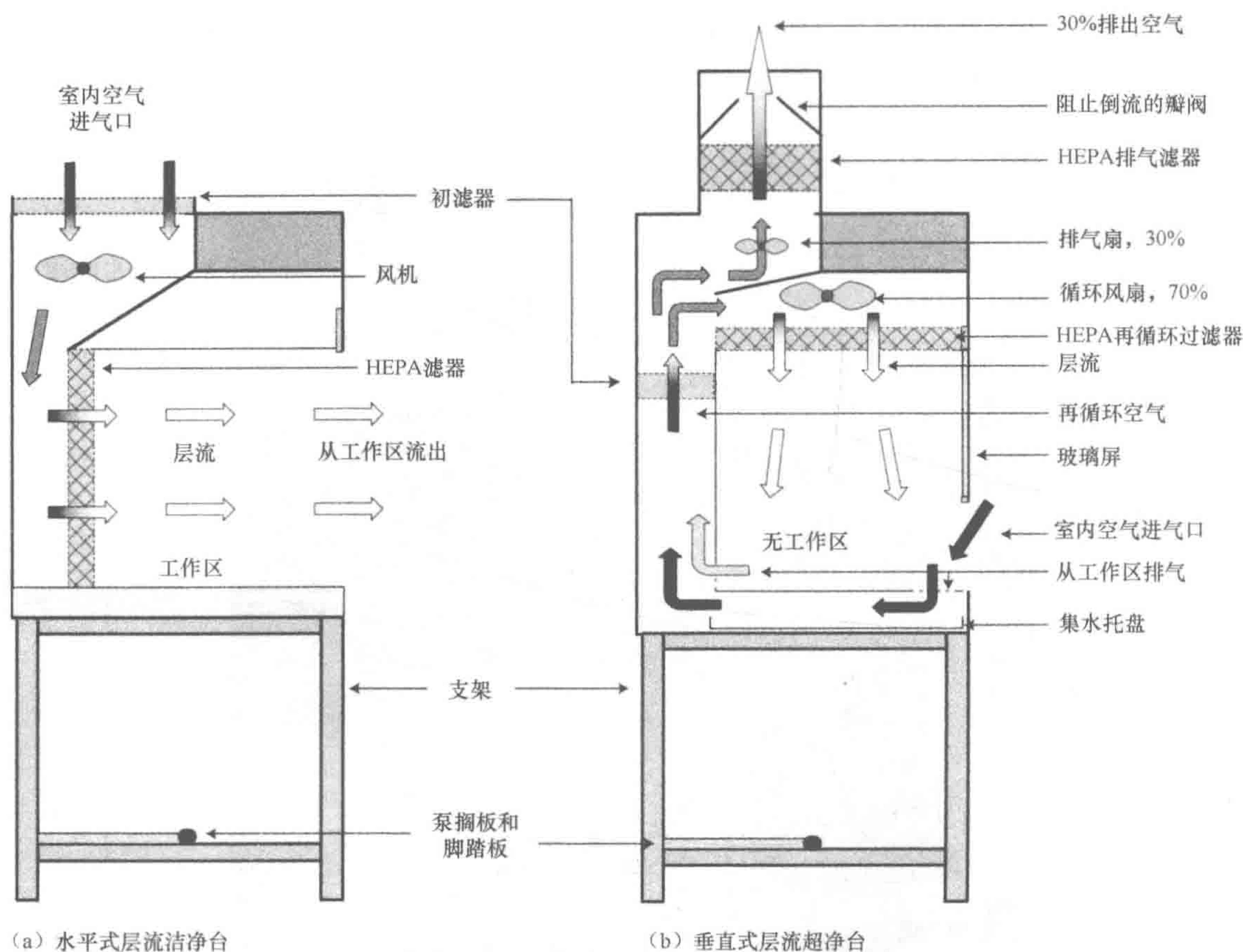


图 5.3 洁净台的气流。箭头指示气流方向。(a) 水平式层流洁净台；(b) 垂直式层流洁净台，作为生物安全柜使用（另见图 6.5）

如果处理有潜在生物危害的材料（人和其他灵长类来源的培养物、病毒感染的培养物等），最好使用Ⅱ级生物安全柜（参见 6.8.2 节，图 6.5a）。实际上，大多数用于细胞培养的层流罩是垂直层流生物安全柜，从现在开始统称为生物安全柜。对化学和放射性化学危害最好的防护办法是使用带有碳过滤的化学安全柜，对再循环气流进行过滤并将废物排到室外（参见 6.5.4 节）。如果

处理的是已知的人类病原体，必须使用在排气口装有病原体捕获器的III级生物安全柜（见 6.8.2 节，图 6.5c）。

生物安全柜的性能与通过滤器后的最小压降程度有关。当滤器阻力增大时，气压落差增加，工作区的空气流速降低，当流速降到低于 0.4m/s（80ft/min）时，层流稳定性减弱，无菌状态无法再维持。压降情况可通过安全柜专用的压力计进行监控，而最好用风速表直接测量气流。

要定期对初滤器进行维护检查（每 3~6 个月检查一次），对水平层流罩来说，关掉风机后，可将初滤器取下丢弃，或用水和肥皂清洗。生物安全柜内的初滤器是内置式的，需要请工程师进行更换；废旧的初滤器首先进行焚烧或高温高压消毒，然后再弃去。

需要每 6 个月对工作台面上方高效微粒空气滤器（HEPA）的气流情况和孔数进行一次监测（可以通过局部气流和微粒数的增加进行检测）。根据鉴定的合同，检测工作最好由专业的工程师来做。生物安全柜的排气口上安装的 HEPA 滤器也要定期更换。当然，这也需要由专业工程师来完成，他们有适当的预防措施，采用焚化方式对废旧滤器进行套袋处理。如果进行的是生物危害性工作（由当地生物安全委员会来确定），在更换滤器前，要封闭工作台进行熏蒸。

应该每周定期对操作台以下部分进行检查，擦掉所有溢出物、清洗托盘，先用 Tego 2001 消毒剂，再用 70%乙醇对整个区域进行消毒。在擦拭完毕后和更换托盘前这一期间，打开紫外线灯（参见下文）30min 可提高消毒效果。当然，此时应立即擦洗，但也有偶尔注意不到的时候，所以有必要进行定期检查。如果在清洗时，药签、纸巾或手套掉在了操作台下面，最终会留在初滤器上而妨碍气流，所以在清洗时要小心，并用反射镜和手电筒定期检查初滤器，查看是否有杂物隐藏在管道系统内。

最好让生物安全柜持续运行，因为这样可保持工作区清洁。它们通常也是通风系统的一个组成部分，这或许是要求连续运行的原因。

在使用安全柜的间隙或者在清洁完毕后，可以用紫外线灯对生物安全柜内的空气及暴露的工作台进行灭菌。紫外线存在辐射危害，特别是对眼睛，6 个月到 1 年后，也会使一些干净的塑料板（如 Perspex 透明塑胶）产生裂痕，特别是紫外线与乙醇联合使用时。

由于紫外线不能进入缝隙中，它的有效性让人怀疑，而乙醇或其他液体消毒剂则更有效，因为它们可通过毛细作用渗入缝隙中。最后，在工作结束并对操作台擦拭完毕后，再进行 30min 的紫外线照射处理或许是一个不错的做法。

紫外线灯需要定期更换，因为它们的光线强度会随着时间逐渐减弱。另外，也应该对紫外线灯定期清洗以尽可能产生最大的照射强度。

▲安全提示 如果使用紫外线灯，必须戴上有保护作用的护目镜，并把暴露的皮肤遮盖好。在紫外线照射时生物安全柜不要打开，更不要使用。

5.2.2 安静区域

假如有一个单独房间或者实验室的一个安静角落很少或极少有人穿行，而且也无其他活动

（参见3.2.1节，图5.2），那样即使没有层流柜也能进行无菌操作。若使用生物安全柜，所选的区域不能有来自门、窗和通风设备产生的气流通过。这个区域要禁止通行，也不能放置产生气流的装置（如离心机、冰箱、冷冻箱等）；空调和静压箱应合理安放，以防排出的气体影响生物安全柜的正常运行（参见3.2节），这个区域的活动只能限于组织培养工作，不允许进行动物和微生物的培养；区域内应保持清洁，没有灰尘，不能放置与组织培养无关的其他仪器设备。非无菌活动，如样品处理、染色或提取应在别处进行。

5.2.3 操作台

必须保持操作台的干净和整洁。应遵守如下规则。

（1）在一个十分干净的操作台上开始工作。

（2）用70%乙醇充分擦洗工作台面（参见附录Ⅰ）。

（3）只能把进行某一特定实验操作时需要的物品拿到操作台上。

（4）在两个实验操作的间隙，需要移除所有不再需要的物品，并擦洗操作台。

（5）布置好自己的工作区，以便：①很容易拿到任何需要的物品，而不是越过某一物品才能拿到另一个；②操作台中央宽敞干净（不只是操作台前缘!），方便操作（图5.4a）。如果很多物品离你太近，那将不可避免地使无菌吸管头部碰到非无菌面（图5.9）。另外，若操作台上挤满了物品，通风柜中的气体就不能有效地层流（图5.4b）。

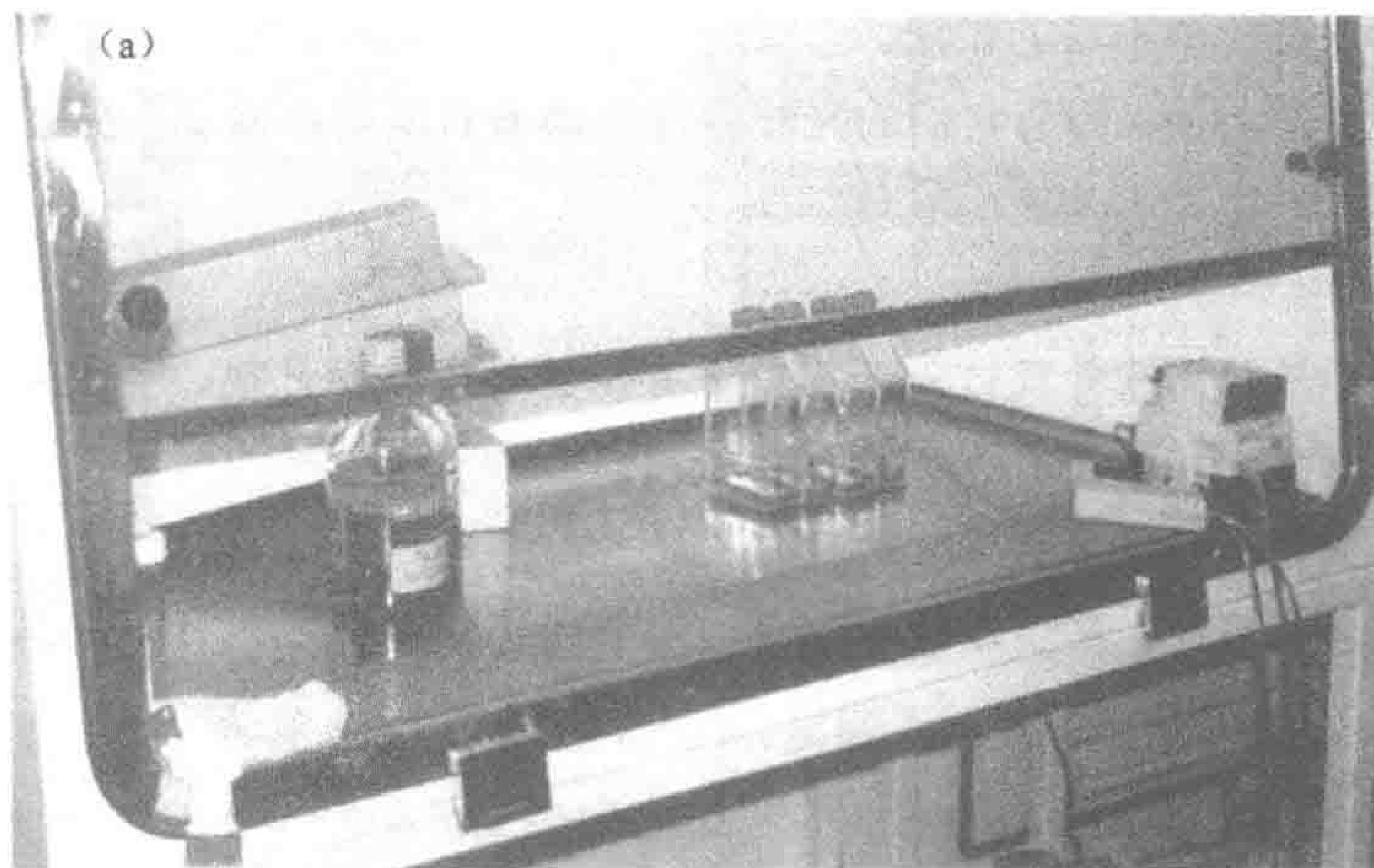
（6）不要让手和其他未消毒的物品（甚至一个外部未经消毒的培养瓶）越过敞开的培养皿和培养瓶。即使在使用水平式层流柜时，也要在中心工作区和高效微粒空气滤器间没有任何障碍物的一个洁净空间工作（图5.5）。

（7）要在你的视线范围内进行操作。例如，将移液管插入洗耳球或移液管控制器中时，吸管头端指向远离你的方向，这样整个过程就会呈现在你的视线之内，不至于被胳膊遮挡（图5.9）。

（8）立即擦去任何溢出物，并用70%乙醇擦拭该区域。

（9）实验结束后，移除所有物品，并再次擦洗操作台。

（10）要定期打扫操作台下方空间，每周至少一次。



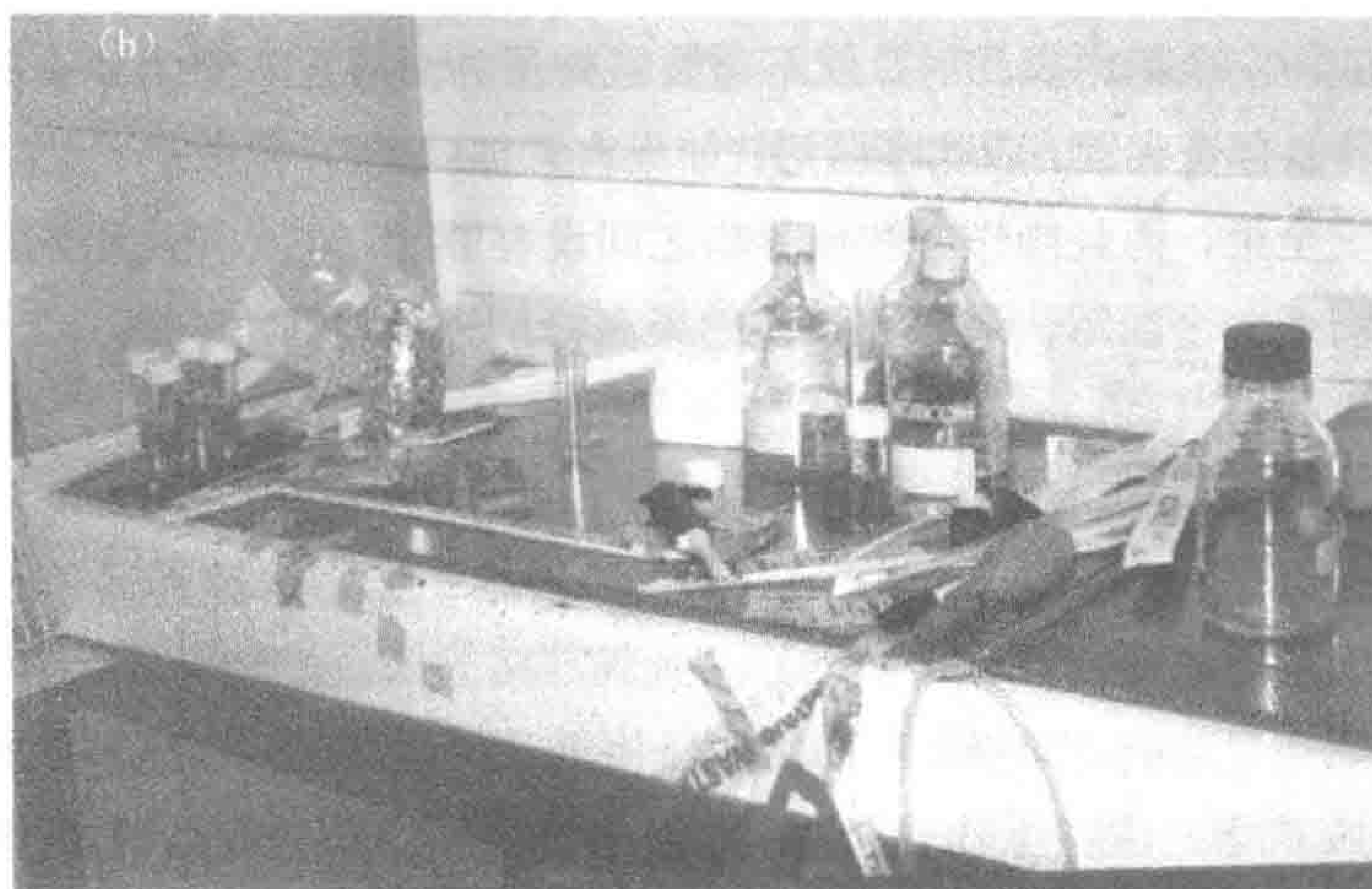


图 5.4 工作区布局。（a）布局正确的生物安全柜。移液管放在左后侧，拿取方便，还能使气流到达后栏处；培养基放置在工作区左侧；培养瓶放在中间并远离前缘，移液控制器在右侧。对左手操作人员来说，可以将摆放位置颠倒过来；（b）布局糟糕的生物安全柜。生物安全柜内太拥挤，许多物品堆放在前面的入气口处，从而破坏空气层流，既影响密封性又影响无菌性

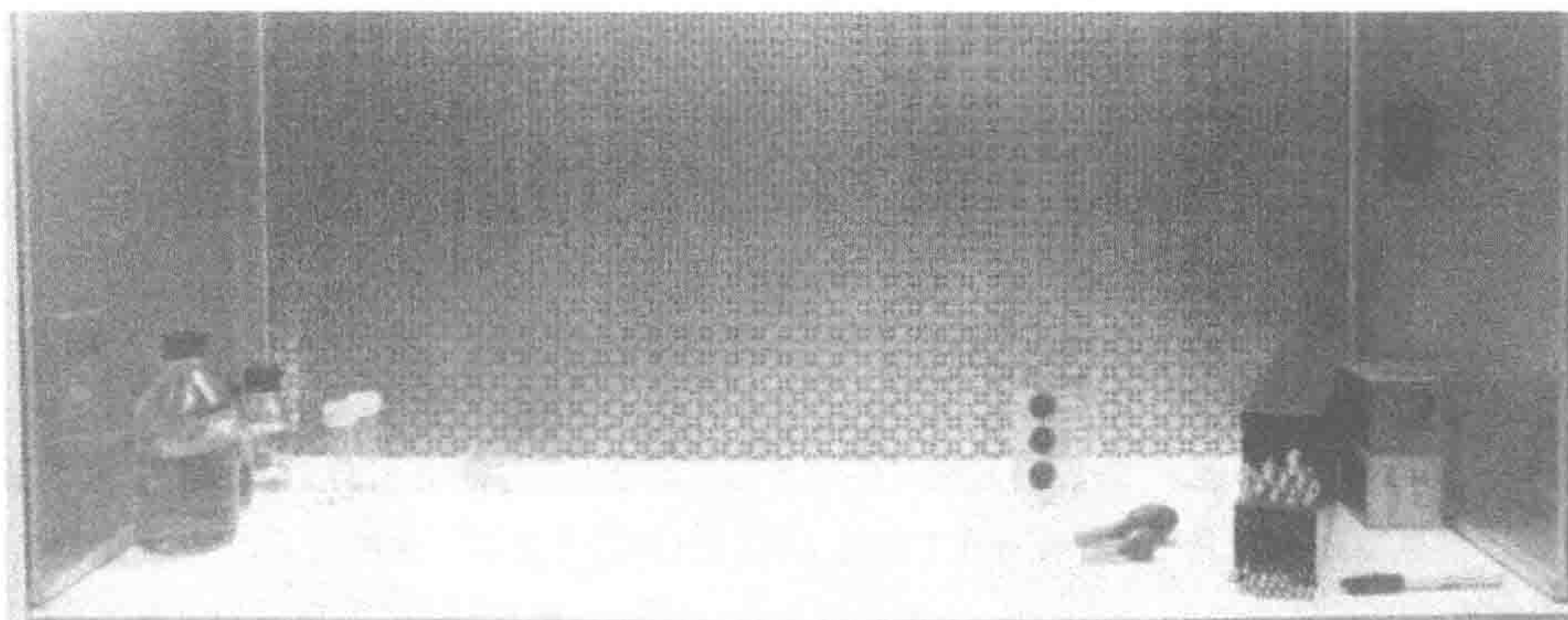


图 5.5 水平层流超净台布局。在水平层流超净台上工作时正确的布局。对用左手操作者来说，可以将摆放位置颠倒过来

5.2.4 个人卫生

像手套、口罩及实验服等个人防护装备有双重功能：保护操作者不受培养物带来的伤害，以及保护培养物免受操作者带来的污染。本节着重探讨的是后者，安全性考虑将放在第 6.5.1 节进行讨论。应该戴上外科手套，并经常对其擦拭消毒，并且要让手套上缘与实验服的袖口重叠在一起（图 5.2c）。尽管戴上手套会降低解除敏感性，但它们为操作者提供了保护，而且比裸露的皮肤更容易保持清洁。当操作者戴上手套去接触和使用共用设备时，手套的无菌性就会大打折扣。不像在手术室中，组织培养用手套是非无菌的，所以应该每隔一定时间用乙醇擦拭一遍。它们仅限于培养室使用，当操作者要离开培养室或者使用电话之类的公共物品时，需要将它们脱掉。

在 GMP 规定的环境下工作时，必须戴上帽子和面罩，穿上长外衣（FDA，2004），但在正常

情况下，特别是在生物安全柜内操作时，就不需要戴帽子和面罩了。应该穿上实验服并只能限于培养室内使用。如果你有长头发，应扎在脑后；如果在开放式工作台上进行无菌操作，禁止说话；如果使用的是生物安全柜，而且操作者和培养物之间设有屏障，说话是允许的，但最好少说。如果你患了感冒，则需戴一个面罩，最好不要在感染高峰期进行任何组织培养工作。

5.2.5 试剂和培养基

从供应商那里购买的商业化的试剂和培养基受到严格的质量控制以确保它们的无菌性，但装它们的瓶子外侧面不是无菌的，一些生产商将瓶子用聚乙烯膜包装，这样可保持瓶子洁净并被允许放在水浴中加热或软化。应在生物安全柜外面拆掉包装。当从冰箱或者水槽中拿出时，要用70%乙醇擦拭这些拆掉包装的试剂瓶。

5.2.6 培养物

从另外一个实验室引入的培养物具有很高的危险性，因为它们可能在源头处或运送途中就已经被污染了。必须对引入的细胞系不断地进行检疫（参见3.2.4节、14.1.8节），如将它们与你自己的其他培养试剂分开处理，并坚持不添加抗生素直到证明它们没有被污染，然后才能将它们与你主要的物品存放在一起。不要经常使用抗生素，因为抗生素虽然能抑制但不能彻底消除某些污染，鼓励使用那些笨拙的技术（参见8.4.7节）。

5.3 无菌处理

5.3.1 擦拭

工作前及工作过程中，特别是有溢出物时，要用70%乙醇擦拭操作台，当实验结束后，要再次对操作台进行擦拭。各种瓶子，特别是从低温储存室或者水槽中取来的瓶子，使用前要对它们擦拭，以后每次使用时，都要进行擦拭；从细胞培养箱里取出的所有瓶子或盒子，使用前也都要进行擦拭。擦拭有时会擦掉标记，所以要使用耐乙醇的记号笔。异丙醇（IPA，也称“外用酒精”）可以代替乙醇使用，作为专用的喷雾剂或者包装好的药签使用。由于甲醇毒性较大，应避免使用。经常使用乙醇会使皮肤孔隙增多，这也是需要戴手套的另外一个原因。

其他一些物质也可用于表面消毒（McDonnell and Russell，1999），但是操作者必须保证没有毒性物质的残留。乙醇因为具有挥发性而不会有任何残留物。常用的浓度为70%的乙醇由于蒸发速度相对较慢，因此杀菌效果最好，而且该浓度的乙醇仍具有活性。

5.3.2 加盖

深螺旋盖与瓶塞相比是首选，虽然在清洗盖子时要特别认真以保证冲洗掉隐藏在橡胶衬垫后

的所有洗涤剂。最好使用无填料的聚丙烯瓶盖或一次性盖子，但如果用在玻璃瓶或玻璃管上时，瓶颈不能有缺损。即使深聚丙烯盖（如 Duran）的使用降低了箔纸包裹的必要性，螺旋盖也要用铝箔包裹，以防瓶颈有灰尘沉积。

5.3.3 灼烧

灼烧往往会除去任何颗粒性灰尘或棉绒，或者至少将这些颗粒性物质粘贴到被灼烧的物品上，这样的话不至于落到无菌区域中。处理时要简单且有条不紊，不要使被灼烧的物品过热，因为这不用于物品的灭菌。在开放式操作台（图 5.6）上操作时要灼烧移液管，另外，在开闭瓶子前后都要对瓶颈和螺旋盖进行灼烧。操作时要靠近火焰，由于对流，火焰附近的气流上升，可减少灰尘下沉，但不要敞开瓶口。螺旋盖敞开一侧应朝下放到一处干净台面上，并在重新盖回瓶口之前进行灼烧。或者在移液时，也可以把螺旋盖拿在手中，以避免放下和再次灼烧（图 5.7）。

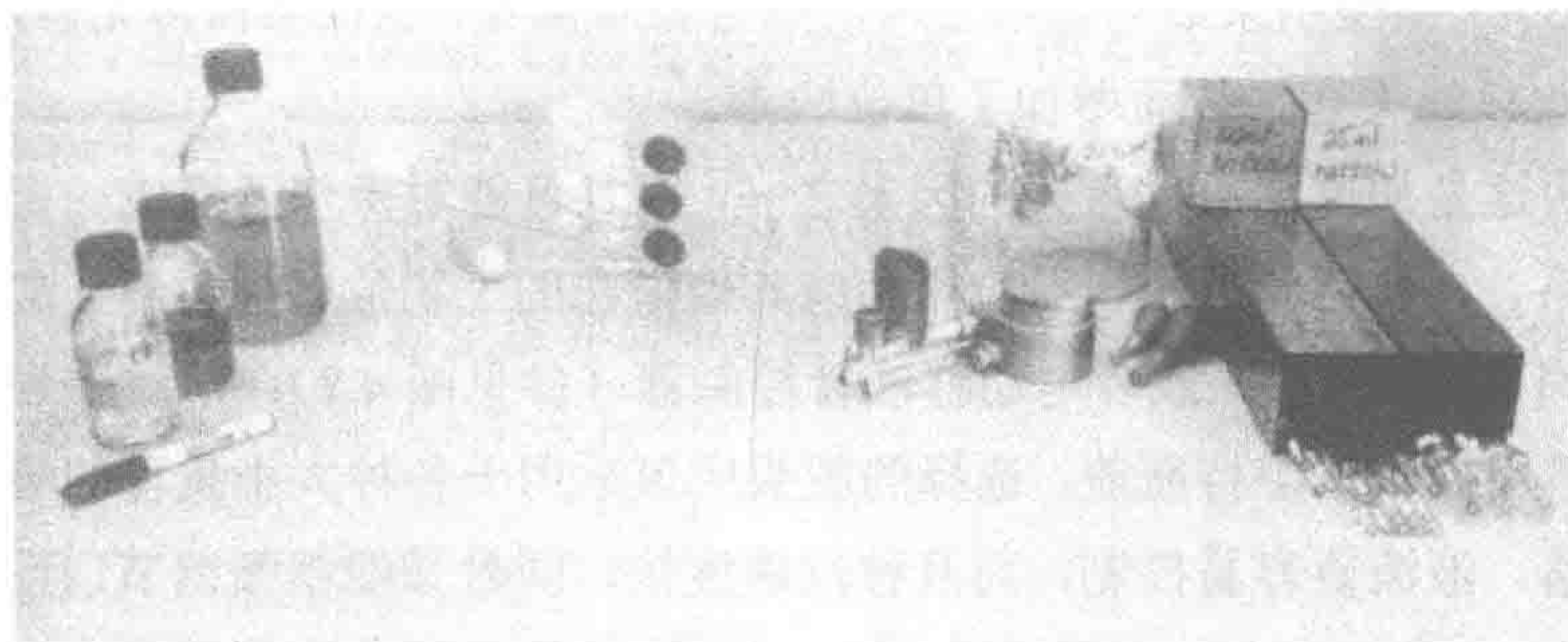


图 5.6 开放式工作台的工作区布局。物品围绕工作台中央洁净区摆放成新月形。本生灯放在工作台中央，以便靠近进行灼烧，并在工作区形成上升气流

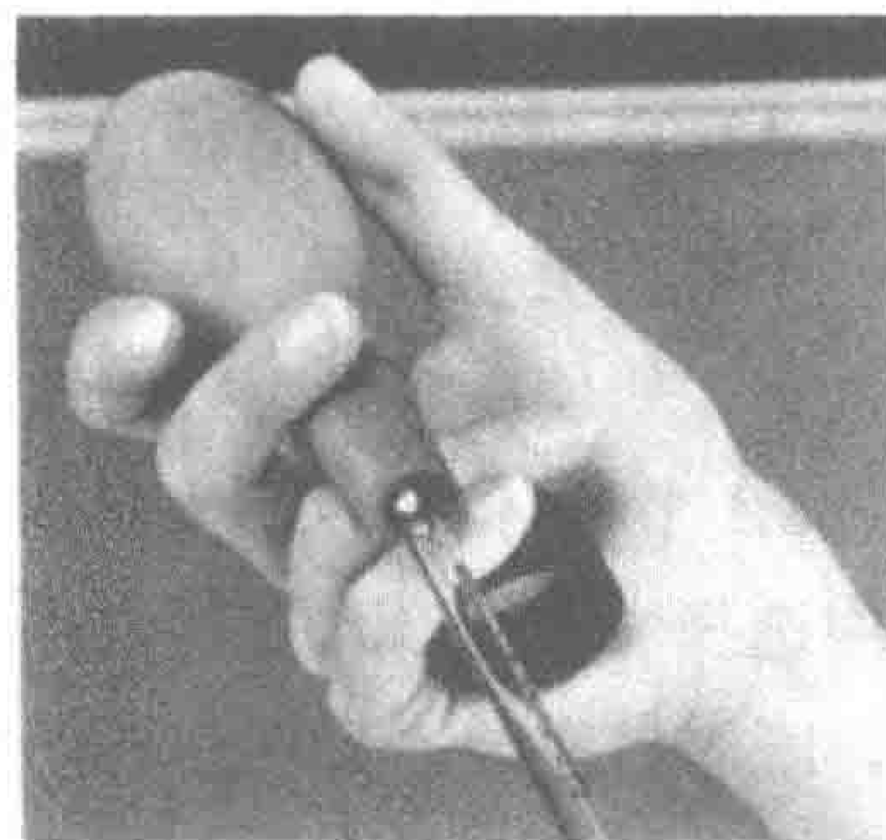


图 5.7 持瓶盖和洗耳球。手拿洗耳球或移液控制器的同时，可以将拧开的盖子夹在小指弯里

当你在一个生物安全柜中操作时，不建议进行灼烧消毒，因为这样会干扰层流，进而影响生物安全柜的无菌，同时也会影响对生物危害性物质的防控效果。明火也可能有火灾隐患，而且会损伤 HEPA 滤器，熔化一部分塑料材质的内部配件。然而，只要酒精灯在生物安全柜外面，就可以用灼烧的方法蒸发掉用于消毒仪器的乙醇。

▲安全提示 必须小心的是，被灼烧的设备直到它们完全熄灭，否则不能与乙醇接触。

5.3.4 试剂瓶和培养瓶的操作

在开放式操作台上操作时，如果瓶口敞开，就不能让瓶子垂直放置，在保证瓶内液体不溢出的前提下，应该尽可能将它们斜放（图 4.9a）。瓶架可用来使试剂瓶或培养瓶保持倾斜。打开的培养瓶应该平放，操作时像试剂瓶那样倾斜放置。当在生物安全柜内操作时，使试剂瓶敞口并垂直放置，但不能让手或其他物品放在敞开容器或无菌吸管与高效微粒空气滤网之间的空间内。当培养瓶需要平放时，斜颈培养瓶则有利于液体移液和分装（Invitrogen- Gibco）。

5.3.5 移液

标准的玻璃吸管的或一次性塑料吸管仍是液体转移操作最简便的方法。有时也用注射器，但注射器的普通针头太短，无法伸入多数瓶子内部，因此不鼓励使用。当用注射器转移细胞时，会产生较大的剪切力，而且这样的操作会增加细胞自体接种的危险。大口径导管好于针头，但移液速度没有那么快，除非用多步进或重复分液器（图 4.5）。

应该选择量程合适的移液器；虽然目前有 100mL 的一次性吸管（BD Biosciences）能用于培养基的制备和定量分装，但 1mL、2mL、5mL、10mL 和 25mL 量程的移液器就能满足大多数实验的需要。使用快流移液器会稍微降低其精确性，但能大大加快移液速度。如果用玻璃吸管移液，并且每次只需要少数几个，就可以将它们一起装筒灭菌，以节省空间。一次性塑料吸管应该双层包装，在放入生物安全柜之前去掉外层包装，但最好是放在一个移液管筒内。散包塑料吸管由于不是双层包装，因此一般不推荐使用。尽管单位成本较低，但在保持无菌的同时，从散装包装中抽取吸管要比单独包装的困难。还有，实验结束后剩余未使用的吸管很难储存，也很难保持无菌，也不能转给其他操作者使用，因此只能丢弃，从而增加了单位成本。

不能用嘴吹吸管，因为已证明这是加速支原体污染的因素之一，而且可能对操作者造成一定的危害，如使用病毒感染的细胞系、人体活检组织、尸检样品或其他潜在的生物危害性材料（参见 6.8.3 节）。但可以用廉价的洗耳球（图 5.7）或者电动移液管控制器（参见图 4.2）；从这些设备中选择一个适合自己的，并试着用同一只手持瓶盖。选择的胶头应该适用于各种大小量程的吸管，既容易安装，又不会自动脱落。液流要容易控制，而且移液速度快，同时又能精细调节。可以上下反复抽吸液体（如分散细胞），还不用担心有残留。移液管应该非常舒服地被握于手中，用一只手就很容易操作，而且不会感到疲劳。

即使是带塞子的移液管，也有液体被抽吸入洗耳球或移液管控制器内的危险，产生微生物污染或交叉污染的危险。如果洗耳球或移液管控制器被液体污染，必须更换新的，而被污染的设备或者弃掉或者进行清洗。大多移液管控制器带的保护性滤膜需要更换。洗耳球不用这么处理，因为它们可以进行冲洗，再用 70%乙醇浸泡，最后晾干即可。

移液器（图 4.3a）特别适合小剂量（≤1mL）液体的转移，虽然现在多数牌子的移液器的移液量可高达 5mL。只有枪头需要灭菌，而枪头的长度限制了所用容器的大小。如果用移液器从一个容器中抽吸灭菌液体，移液器没有灭菌的杆部不能碰触容器的内侧面。可以对规格为 10~20mL 的试剂以 5μL~1mL 剂量分装到样品管中，或者对 Bijou 瓶中或者类似的小药瓶中液体进行 5~200μL 剂量的分装，但从较大容器中抽吸液体会有污染的风险。较长的枪头可以用来抽吸较大剂量的液体。移液器尤其适合微量滴定，而用多道移液器就可以进行其他多孔板移液操作（图 4.3b）。但移液器不适合连续传代，除非有滤网吸头。要注意区分开无 RNA 酶的、非无菌“PCR 洁净级”枪头和无菌的、细胞培养级枪头之间的不同。

在组织培养中，移液常遇到的问题是速度和精确性之间的矛盾。在继代培养操作过程中，为尽可能减少对细胞的损伤，需要快速移液；但在细胞系维持过程中，为了实验的可重复性，则要求移液的精确性。除非是精确性要求很高的实验，在其他情况下，一般允许有±5%的误差。一般

情况下，对于大多数定量实验而言，使用最小的移液管可使其结果的精确性提高，而较大的移液管能够加快连续分装速度，但精确度会降低。

要在玻璃吸管的顶端加一个棉塞，保持在使用中移液管的无菌性。新生产出的塑料移液管一般配有一个合适的塞子，但在清洗干燥之后、灭菌之前需要将塞子塞进玻璃吸管。塞子能阻止洗耳球或移液控制器插进吸管造成的污染，还可以减少因不小心使移液管内容物进入控制器引起的交叉污染。如果塞子变湿，就将移液管丢弃。为无菌操作中的吸管加棉塞是一项十分烦琐的工作，清洗前去掉棉塞同样如此。目前有半自动吸管加塞机（参见图 10.6）可用，它可加快操作进程，化繁为简，并用压缩空气吹掉旧塞子。

在安装自动移液设备和重复移液器时，必须要小心避免污染（参见 4.2.3 节）。然而，快速分装可以减少疲劳，同时还可缩短培养皿与污染物接触的时间。

5.3.6 大容量移液

当培养器皿中的培养基超过 100mL 时，就要采用另一种方法转移液体。如果涉及的培养瓶较少，用一个 100mL 的移液管或刻度瓶（图 4.4）或者培养基袋就完全足够了。但如果需要较大体积（≥500mL）的培养基或大批量的培养基，最好使用蠕动泵。更大容量（10~10 000L）的液体转移一般通过在密闭式压力容器中制备培养基的方法实现，接着通过高温高压蒸汽灭菌，然后通过正压将其转移至培养皿中。也可以用灌注法分装大容量液体，但只能适用于预先测量样品的一次移液（参见 5.3.7 节）。

5.3.7 液体倾倒

任何时候都不要把液体从一个无菌容器倒入另一个无菌容器，除非你倾倒的试剂瓶只用一次，而且是将全部内容物（预先测量过的）一次性倒入一个容器。倾倒的主要危害是在试剂瓶内、外两侧之间形成了一个液体桥，在储存和培养过程中，有可能使污染物进入试剂瓶内。

5.4 标准化操作

良好的无菌技术的核心体现在许多标准的良好实验室规范准则上（表 5.1）。保持一个干净明亮的工作空间，并且仅仅放置一些一次实验操作所需的物品或材料。尽可能提前准备好，这样会缩短培养物在培养箱外的时间，使各种操作快速、轻松和顺利。将台上所有一切都时刻保持在视线内，时时警惕无菌表面和非无菌表面间的意外接触。实验完毕后，要保持操作区干净整洁。

表 5.1 良好的无菌技术

要目	良好	不佳
层流净化罩	使用前后擦拭；生物安全柜内的设备和实验材料尽可能少；在视线所及范围内工作	生物安全柜杂乱；生物安全柜内一团糟即离开
污染	不用抗生素进行培养；定期肉眼和显微镜检查培养物；将培养皿和多孔培养板装入盒内	组织培养中打开被污染的培养瓶；携带感染的甚至带有抗生素的细胞；留下不明污染物；未做安全处理（参见 14.4 节）

续表

要目	良好	不佳
支原体	常规细胞检查	携带感染的细胞；试图净化培养物
引入细胞系	来源可靠，如来自细胞库（表 15.5）；隔离新引入的细胞系；做支原体检查；验证来源（即使是来源于祖细胞的细胞）；做好记录	源于与祖细胞关系很远的一个细胞系，而不是来自一个著名的细胞库
输出细胞系	支原体检查；验证来源；提供数据单；三层包装	送出被污染的细胞系；传递未经证实的培养物
玻璃器皿	分开保存储存	用于常规实验操作
培养瓶	移液时培养瓶倾斜； 气体来自 CO_2 过滤管； 若密封和叠放，需在37℃条件下通风	培养瓶一次打开得太多 除非带有透气帽，否则需要向 CO_2 培养箱充气 堆放过高（图 5.10）
培养基和试剂	放入生物安全柜前擦拭瓶子；只有在生物安全柜内才能打开	细胞系间共用；与其他人共用；倾倒
移液管	用带塞子的移液管；若污染或塞子潮湿则需更换移液管；用塑料移液管吸琼脂	不同细胞系共用一个移液管；与他人共用；溢出废物处理筒

下面的两个实验方案（方案 5.1 和方案 5.2）重点强调的是无菌技术（另见第 27 章，练习 1）。培养基制备和其他操作适当的标题下将作更详细的讨论（参见 10.4 节，另见图 5.8、图 5.9）。

方案 5.1　生物安全柜内的无菌技术

概要

清洁和擦拭工作区，将瓶子、吸管和其他设备带进来（图 5.4a）。首先是做准备工作（培养基和其他试剂的配制），然后进行细胞培养工作。结束后整理操作台并用 70%乙醇擦拭台面。

材料

无菌（放入生物安全柜内）

- 培养基
- 移液管，带刻度的，带塞子的，按照 1mL、5mL、10mL、25mL 等不同规格
  若是玻璃的，将玻璃移液管分类装在方形吸管筒中，进行干热灭菌或者高压蒸汽灭菌
  若是塑料的，在外层包装纸内再将一次性塑料移液管进行单独包装（拆下外层包装，将移液管放置灭菌筒内或吸管架上）
- 培养瓶

非无菌

- 移液控制器或洗耳球，置于生物安全柜内（参见图 4.12 和图 5.7）
- 装有 70%乙醇的喷壶，置于生物安全柜中（参见附录Ⅰ）
- 无绒棉球或抹布，置于生物安全柜旁

- 吸水纸巾，置于生物安全柜旁
- 带有水和消毒剂（参见 6.8.5 节）的移液管筒（参见 6.8.6 节）或托架内双层厚度的高压生物灭菌袋废物袋，置于生物安全柜旁地面上
- 废物筐（装废弃的纸、棉签和包装纸），放在生物安全柜旁地面上，另一侧放置移液管筒或废物袋
- 吸液器的吸入管线（图 4.9）或带盖的废液烧杯（图 5.8）（均含消毒剂），分别置于生物安全柜内、安全柜下方
- 剪刀
- 耐乙醇的墨水记号笔
- 笔记本、笔、实验方案

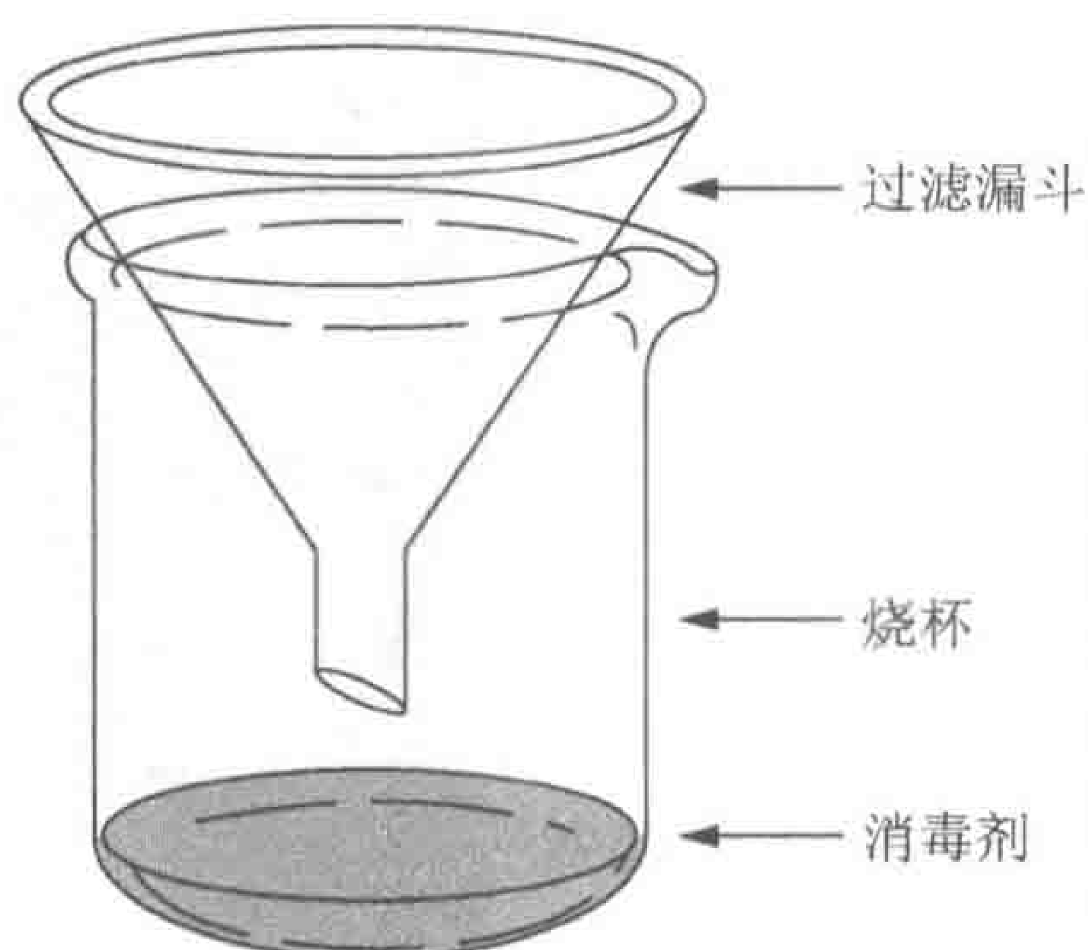


图 5.8 废液烧杯。过滤漏斗可防止内容物从烧杯中溅出

操作步骤

1. 用 70%酒精棉球或消毒纸巾擦拭生物安全柜内的操作台面及所有柜内摆放的物品，还包括前面的玻璃屏风内侧面。

2. 从冷室、水浴槽中取出培养基及所用试剂或者其他从冷冻箱内取出带溶解的物品，用乙醇擦拭试剂瓶，并将自己首先要用到的物品摆放到生物安全柜中。

3. 将移液管放到生物安全柜后侧面并易于拿到的地方（图 5.4a）。

4. 打开移液管筒，将盖子放在顶部或斜在一侧，筒口朝下，或者将所有独立包装的塑料移液管按照规格归类放在架子上或管筒内。

5. 整理好其他玻璃器皿、塑料制品及你所需要的仪器设备，将它们放在推车中或附近的工作台上。

6. 拧松但不要移走所有要使用的培养瓶盖子。

7. 打开自己将要用移液管移入溶液的培养瓶瓶盖，以及要从中吸取溶液的试剂瓶瓶盖。将瓶盖口朝上放到生物安全柜后部或试剂瓶的后面，保证手不会从其上方穿过。如果一次仅打开一个瓶盖，可以把盖子夹在小指和手掌之间的掌弯处（图 5.7）。移液完成后，将盖子重新盖回原来的瓶子上。

8. 选择移液管。

（a）如果选玻璃移液管：

（i）从盒中取移液管时，要保持待取移液管与其他移液管平行，尽量少碰及其他物件，特别是移液管滴头（如果待取的移液管碰触到了盒内其他移液管的底部，请丢弃它）；

（ii）在移液管末端安入一个移液控制器或洗耳球，管口不要朝向自己。一定要握在刻度上端，这样可保证移液管进入试剂瓶或培养瓶的部分不会被污染（图 5.9）。

（b）如果选独立包装的塑料移液管：

（i）从顶部打开移液管的包装；

（ii）剥开包装纸，使外皮卷向内面；

（iii）将移液管末端安上洗耳球或移液控制器；

（iv）从包装中取出移液管，保证不接触到包装外面部分或移液管碰到其他未灭菌物的表面（图 5.9）；

（v）将包装纸丢进废物筐中。

▲安全提示 将移液管插入洗耳球中或移液控制器时不要过分使劲，用力太大会导致移液管破裂（参见 6.5.3 节，图 6.2）。

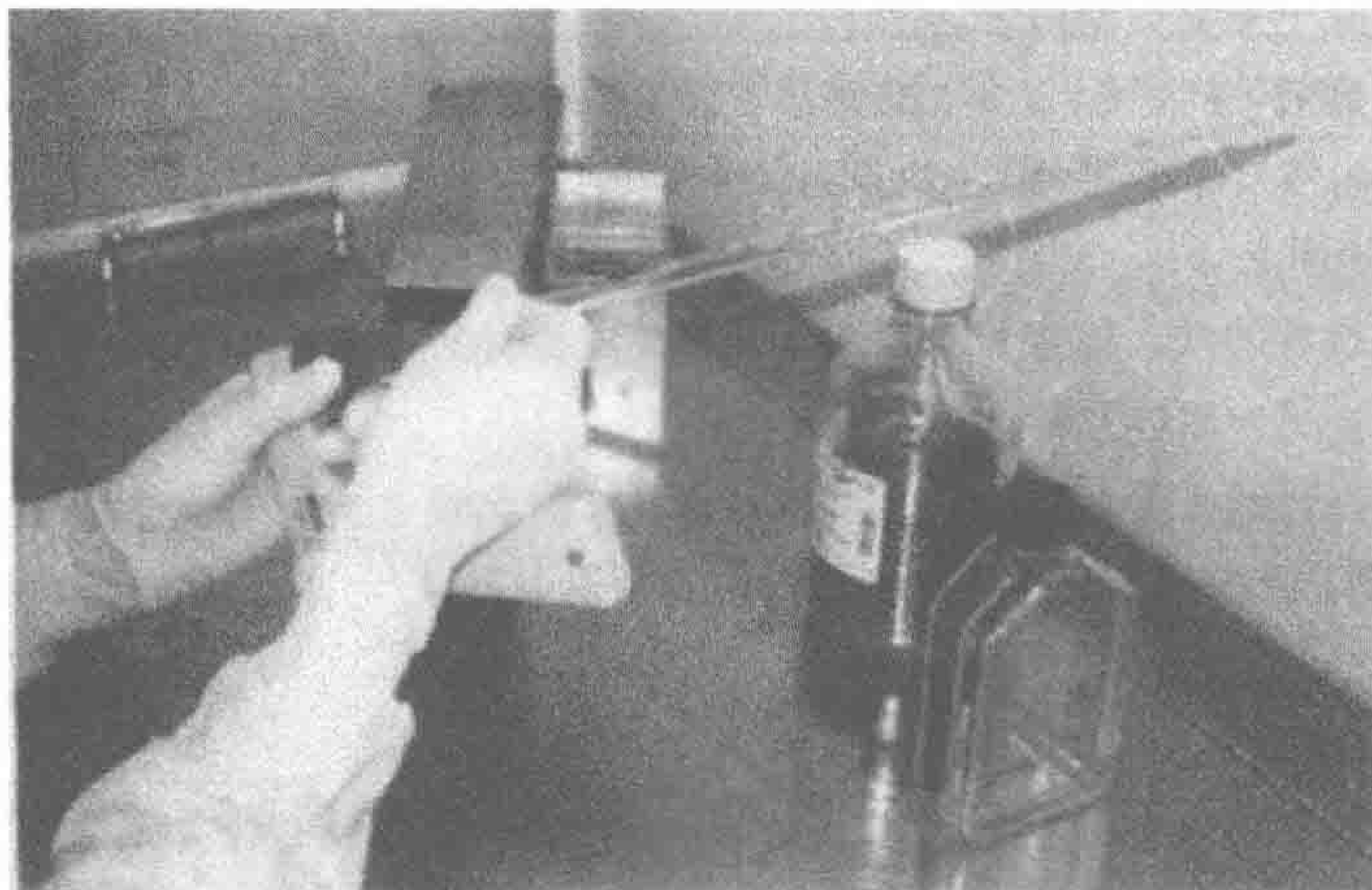


图 5.9　移液管插入移液控制器的方法。移液管的正确插入方式是手紧握移液管（在刻度上端），吸管指向远离操作者的方向。划圈区域指示的是潜在的危险，即不小心碰触到瓶子和通风橱的背面

9．当插上洗耳球或移液控制器的移液管时，它们与手臂保持垂直的角度，注意移液管的头部不要碰及培养瓶的外部或生物安全柜内表面（参见图 5.9 圈定区域）；时刻注意移液管的位置。当学习无菌操作技术时，这个过程并不容易，但它是成功实验的一个重要因素，多加练习则熟能生巧。

10．将含有培养基的培养瓶斜向手中拿的移液管，这样手便不会越过打开的瓶口，用移液管吸取 5mL 培养液并将其转移到一个培养瓶中。

11．把用过的吸管放入盛有消毒剂的移液管筒内。若是塑料移液管，则放入双层厚度的高压生物灭菌袋中。

12．将培养瓶重新盖上盖子。

13．将培养基液瓶和培养瓶的盖子盖上。在完成某一特定训练项目时，瓶口可以暂时敞开。但不论任何原因要离开生物安全柜时，一定要盖上瓶子盖子。

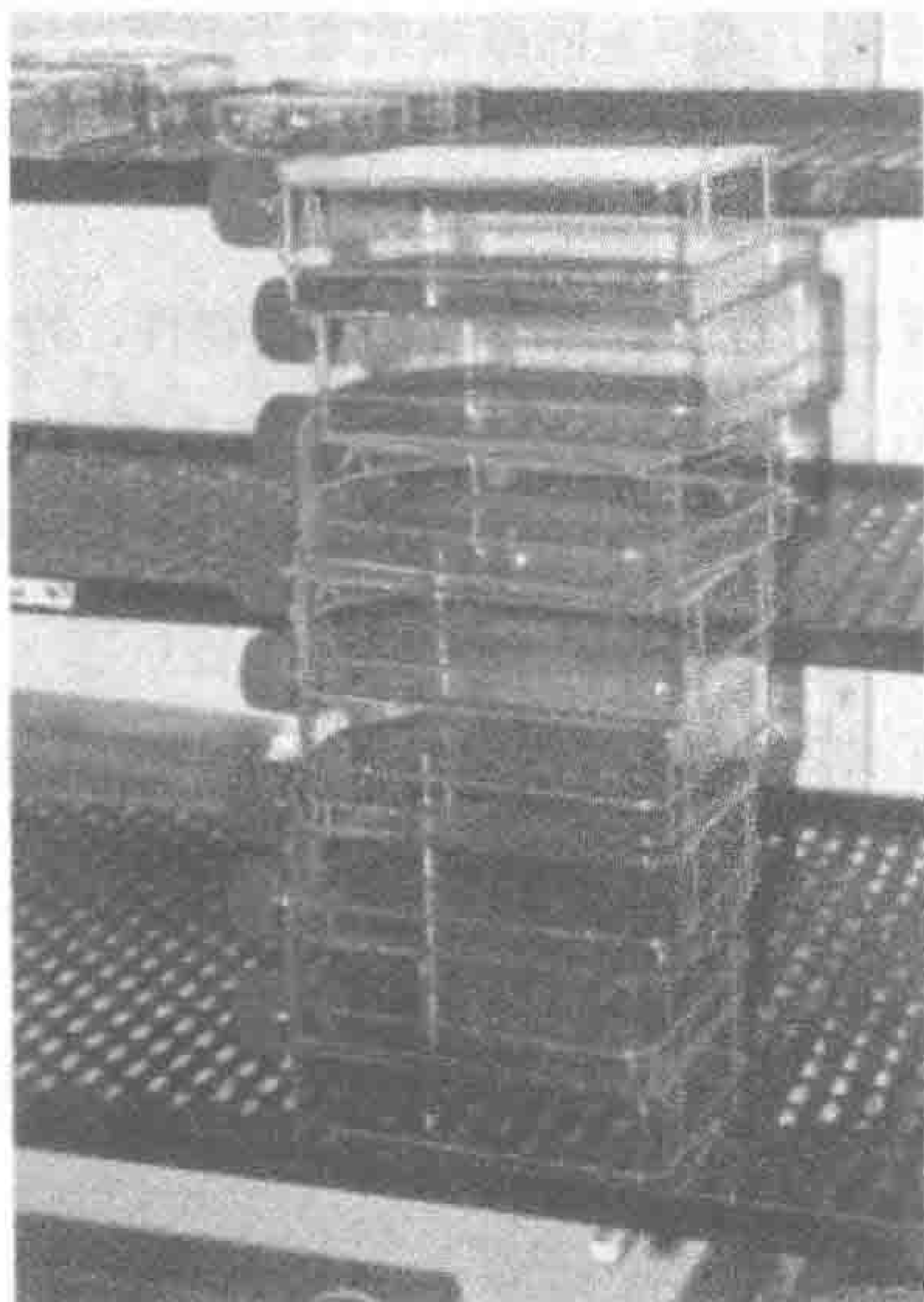


图 5.10　倾斜的培养瓶。培养箱内或温室内的培养瓶内部气体膨胀。对大培养瓶来说，会导致培养瓶出现突起，引起培养瓶倾斜，随着堆放高度的增加会更加倾斜

注意事项　在垂直式层流超净台中工作时，不要在立即打开的试剂瓶的上方操作；在水平式层流超净台中工作时，不要在敞口的器皿后面操作。

14．操作完成后，拧紧所有瓶盖，将培养瓶放入培养箱。

注意事项　如果存放空间有限，要求培养瓶叠放在培养箱中时，在放入培养箱内约 30min 后，需要适当地释放培养瓶内的压力，因为培养瓶，特别是大培养瓶（图 5.10）易气体膨胀而发生变形。但不适用于通气盖。

15．将不再需要的溶液和实验材料移走，并擦净工作台面。

16．如果用的是灭菌筒独立包装的塑料移液

管，可以重新将灭菌筒盖上盖子，剩下的移液管可在下次实验时使用。而没有用过的玻璃移液管需要返回到准备区重新灭菌。

方案 5.2 在开放式工作台上进行操作

概要

清洁并擦拭工作区，准备好试剂瓶、培养瓶、移液管、其他器具和试剂（图 5.6）。首先是做准备工作。将培养基从试剂瓶转移到培养瓶。必要时对相关器具灼烧消毒，保持工作台面干净整洁。最后整理台面，用 70%乙醇擦拭工作台。

材料

无菌或无菌制备

- 培养基
- 移液管，带刻度的，带塞子的，按照 1mL、5mL、10mL、25mL 等不同规格
  若是玻璃的，将玻璃移液管分类装在方形吸管筒中，进行干热灭菌或者高压蒸汽灭菌
  若是塑料的，在外层包装纸内再将一次性塑料移液管进行单独包装（拆下外层包装，将移液管放置灭菌筒内或吸管架上）
- 培养瓶

非无菌

- 移液控制器或洗耳球（图 4.2，图 5.7）
- 装有 70%乙醇的喷壶
- 无绒棉球或抹布
- 吸水纸巾
- 装有水和消毒剂（参见 6.8.5 节）的移液管筒（参见 6.8.6 节）或托架内双层厚度的高压生物灭菌袋废物袋，置地面的一侧
- 废物筐（装废弃的纸、棉签和包装纸），另一侧放置吸管筒或废物袋
- 生物安全柜内的吸液器的吸入管线（参见图 4.9）或安全柜下方的带盖废弃烧杯（图 5.8）（均含消毒剂）
- 本生灯（或相似器具）和打火机
- 剪刀
- 耐乙醇的记号笔
- 笔记本、钢笔、实验方案等

操作步骤

1. 用 70%乙醇擦拭工作台面。

2. 从冷室、水浴槽中取出培养基及所用试剂或者其他从冷冻箱内取出带溶解的物品，用乙醇擦拭试剂瓶，并将首先要用到的物品摆放到工作区的操作台上。其他物品放置一边。

3. 在工作区安排如下操作，即将培养基从一个试剂瓶移到一个培养瓶内，操作要在靠近本生灯的台面上进行，此处的气流因对流原因向上流动。

4. 将移液管放到工作台面一侧易于拿到的地方（图 5.6）。

（a）若是玻璃移液管，打开移液管筒，将盖子放在顶部或斜在一侧，筒口朝下。

（b）若是塑料移液管，拆掉外层包装，将里面独立包装的移液管按照规格归类放在架子上或管筒内。

5．整理好其他玻璃器皿、塑料制品及需要的器具，把它们放置在近旁。

6．在火焰中快速旋转灼烧瓶颈，并松开瓶盖。

7．选择移液管。

（a）如果是玻璃制品：

（i）从盒中取移液管时，要保持待取移液管与其他移液管平行，尽量少碰及其他物件，特别是移液管滴头（如果待取的移液管碰触到了盒内其他移液管的底部，请丢弃它）；

（ii）在移液管末端安入一个移液控制器或洗耳球，管口不要朝向自己。一定要握在刻度上端，这样可保证移液管进入试剂瓶或培养瓶的部分不会被污染（图 5.9）。

（b）如果是塑料制品：

（i）从顶部打开移液管的包装；

（ii）剥开包装纸，使外皮卷向内面；

（iii）将移液管末端安上洗耳球或移液控制器；

（iv）从包装中取出移液管，保证不接触到包装外面部分或移液管碰到其他未灭菌物的表面（图 5.9）；

（v）将包装纸丢进废物筐中。

8．推动移液管（仅玻璃制品）纵向穿过火焰，旋转 180°后再通过火焰返回。过程仅持续 2~3s，否则会造成移液管过热。如果碰触到任何物件或者通过任何其他方式污染了移液管，请丢弃它，而不要试图通过灼烧再对移液管灭菌。勿对塑料移液管灼烧。

9．将移液管插入洗耳球或移液控制器中，管口不要朝向自己。手一定要握在刻度上端，这样移液管进入试剂瓶或培养瓶的部分不会被污染（图 5.9）。

▲安全提示 将移液管插入洗耳球时不要用劲过大，否则移液管会破裂（图 6.2）。

10．当插上洗耳球或移液控制器的移液管时，它们与手臂保持垂直的角度，注意移液管的头部不要碰及培养瓶或移液管筒的外部；时刻注意移液管的位置。当学习无菌操作技术时，这个过程并不容易，但它是成功实验的一个重要因素，多加练习则熟能生巧。

11．不要让移液管管口朝向自己，将第一个试剂瓶的盖子夹在小指和手掌之间的掌弯处（图 5.7）。当你用移液管转移液体到好几个培养瓶或试剂瓶中时，瓶子可以摞起平放。操作时让瓶子倾斜，这样你的手不会越过瓶颈口。如果手拿着瓶盖移液比较困难，就口朝下将盖子放到台面上。如果瓶子暂时不需要盖盖子时，应该将它们倾斜尽可能接近水平放置在台面上或瓶架上。应尽量靠近位于气流上升区的酒精灯处操作。

12．灼烧瓶颈。

注意事项 请勿灼烧插有带倾倒环的塑料制品的瓶子。

13．将培养瓶斜向手中的移液管，这样手便不会越过打开的瓶口。

14．吸出所需要的液体量，并握紧移液管。

15．灼烧瓶颈，重新盖盖子。

16．丢弃接收瓶的瓶盖，灼烧瓶颈，添加液体，再灼烧瓶颈和瓶口，换用新瓶盖。

17．操作完成后，拧紧瓶盖。

18．将不再需要的溶液和实验材料从超净台移走，擦净工作台面。

19．如果移液管筒中装的是独立包装的塑料移液管，可以重新将移液管筒盖上盖子，到下次再用。没有用过的玻璃移液管则需要返回到准备区重新灭菌。

5.4.1 培养瓶和试剂瓶

5.4.2 培养皿和多孔培养板

由于以下原因，培养皿和多孔培养板特别容易受到污染。

（1）培养皿打开后，暴露的表面积较大。

（2）对打开的培养皿操作时，有碰到培养皿边缘的危险。

（3）如果取下盖子放在台面上，有通过盖子将工作台面上的污染物带入培养皿的风险。

（4）在向培养箱转移途中，如果培养皿倾斜或出现晃动，培养基会因为毛细作用进入盖子和培养皿之间的缝隙。

（5）CO_2 培养箱中潮湿气体的污染危害性更高。

以下操作会尽可能降低污染风险。

（1）培养皿打开的时间不宜过长。

（2）不要在打开的培养皿或皿盖上方工作。

（3）当移动培养皿或来回进出培养箱时，不要倾斜、旋转或使它们产生晃动，以防培养液流进盖子和培养皿边缘的缝隙中。进一步的预防措施如下。

（a）用通风的培养皿（图 7.8）。

（b）如果此处仍有培养基存留，弃掉盖子，用蘸 70%乙醇的无菌吸水纸小心地从盖子外边缘拭去培养基，换上新的培养皿盖子（确保样品标记在培养皿的底部！）。

（4）将培养皿和培养板放入一个透明塑料盒里培养，当从培养箱中取出盒子时，要用乙醇擦拭盒子（图 5.11，见 5.5.3 节）。

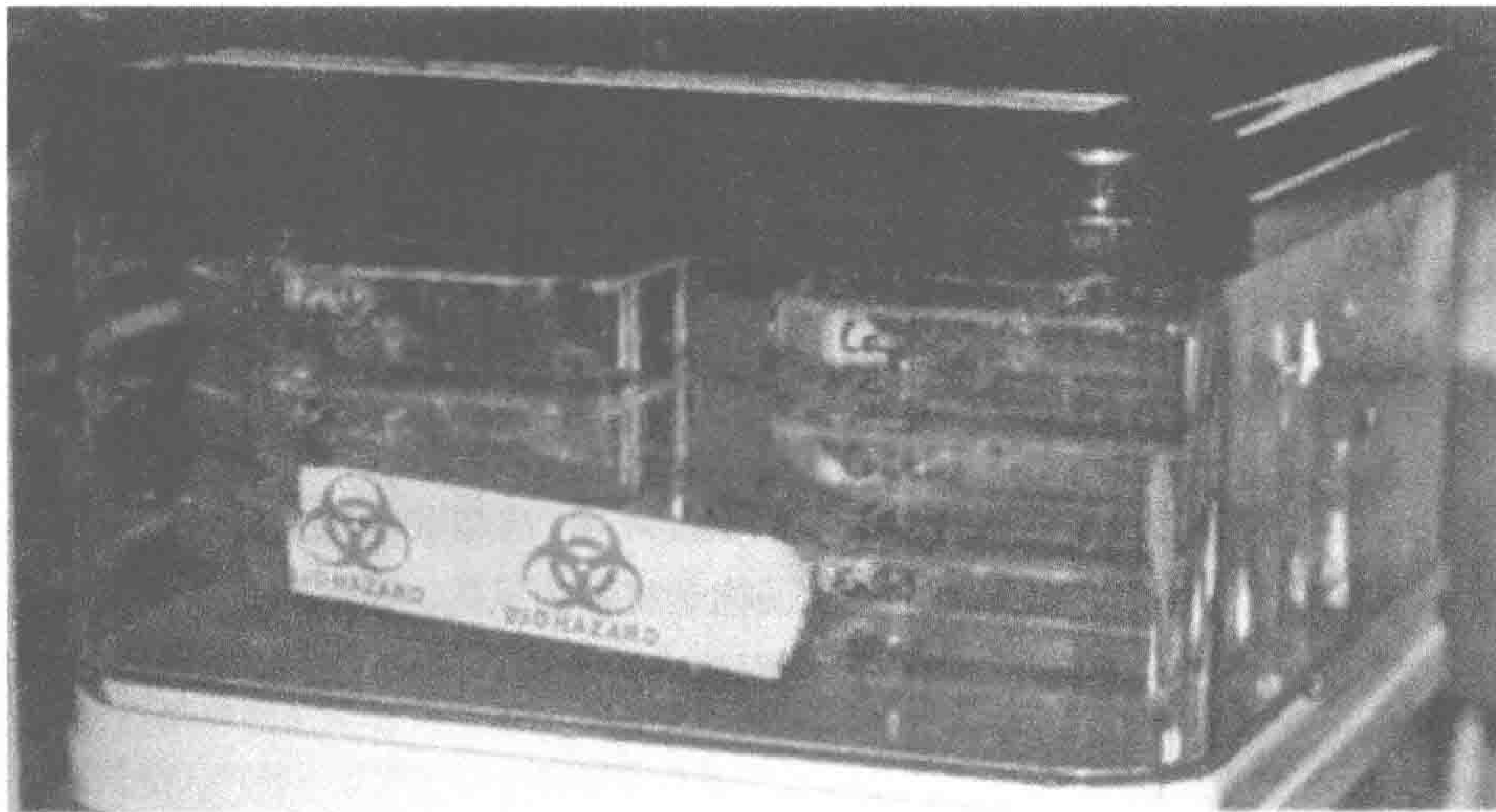


图 5.11 盒装培养皿。 透明盒子，如三明治盒或蛋糕盒，可用于保护温湿培养箱中未密封的培养皿和培养板免受污染。这类容器也可用于放置生物危害性材料，以及容纳意外溅出的溢出物（生物危害性材料需要一个密封容器和一个单独的培养箱）

推荐用以下方法（方案 5.3）进行培养皿和多孔板的操作。

方案 5.3 培养皿和培养板的操作

材料

同方案 5.1、方案 5.2。

操作步骤

1. 把培养皿或培养板放在工作区一侧。
2. 放置培养基瓶，松开瓶盖。
3. 把培养皿放到工作区的中心。
4. 拿开培养基瓶盖，用移液管从中抽取液体培养基。
5. 拿开培养皿盖子。
6. 往培养皿中添加培养基，轻轻地直接加到培养皿底部的一边。
7. 盖好盖子。
8. 把培养皿放在开始堆放培养皿的一侧。注意不要让培养基进入培养基上缘与盖子之间的空隙中。
9. 弃去移液管。
10. 拧紧培养基瓶的盖子。
11. 将不再需要的溶液和实验材料从工作台上移走，并擦拭工作台面。

5.5 仪器和设备

在组织培养区的所有仪器设备均需定期清洁，以避免灰尘沉积和防止微生物在偶然溅出物上生长。替换物，如气瓶，在进入组织培养区前必须进行清洁处理。进行无菌操作过程中，不要让仪器设备有大的挪动。

5.5.1 冰箱和冷室

由于每次开门时潮湿的空气进入冷凝造成的潮湿环境，冰箱和冷藏室的墙壁会出现累积真菌污染的趋势。潮湿的空气增加了储藏的瓶子上面孢子沉积的风险，因此瓶子在放入通风橱前应该用乙醇擦拭（参见 5.5 节）。每隔几个月，冷藏库就应被清洁，墙壁和支架应该用消毒剂清洗。

5.5.2 恒温箱

污染的一个主要来源是湿式恒温箱（参见 14.1.4 节）。任何溢出物都要用灭菌抹布立即擦掉。恒温箱中的水要每周用灭菌反渗水（RO）或去离子水（不是超纯水）更换一次。恒湿箱要定期清理（根据空气污染情况和使用频率，每周一次或每月一次），移走包括所有架子、托盘等在内的物品，用 Decon 或 RoccalD（Pfizer）等无毒去污剂彻底清洗恒温箱内部、架子和隔板，然后

用 70%乙醇洗去去污剂残迹。待乙醇完全挥发后，再把样品架和培养物放回去。若有可能，在每次清理恒温箱时，最好将支架、隔板和加湿托盘进行高压灭菌（见方案 5.4）。

一些恒温箱可以利用高温高湿或紫外线提供灭菌程序。这样的程序或许在控制污染方面很有用，但往往意味着在灭菌过程中恒温箱有较长一段时间无法使用。而且，紫外线杀菌时，光线不能到达罅隙内。

清理频率一般与恒温箱所放位置有关；对于室内空气已被过滤的洁净区来说，每月一次已经足够了，但若实验室建在农村，正在进行工程建设或者翻新时清理间期则要缩短，因为此时的孢子数会增多。使用频率过高也会增加真菌污染的概率。但恒温箱正在使用时，任何溢出物都必须立即清除，并且被污染的培养物一旦被发现就要立即清除掉。

可以把杀真菌剂，如 2% Rocall 或 1% 硫酸铜放在培养箱底部的加湿托盘内，以阻止真菌生长。但这些杀真菌剂仅限于它们能接触到的表面，并不能真正代替定期清洗。一些培养箱有高温灭菌循环装置。一些风机循环式恒温箱有微孔过滤器和层流，可以阻止微生物的循环。但要接受的一点是，去掉风扇，依靠对流进行空气循环的恢复期，微生物数量会有一个略微增加（参见 4.3.2 节）。

方案 5.4 清洁孵箱

概要

将培养物移至一个替代恒温箱，关掉清空的恒温箱，用清洁剂和乙醇清洗，打开加热开关，干燥恒温箱。补充托盘中的水，恢复 CO_2 供给。

材料

非无菌

- 含有 2%四级铵化合物或者等量真菌抑制剂的水，再次注满水盘
- 替代的 CO_2 恒温箱或者塑料盒密封胶带
- 清洁剂：1%四级铵化合物或者其他杀真菌清洁剂
- 乙醇：70%

操作步骤

1. 移除所有培养物品至另一个 CO_2 恒温箱，或者封装培养物品在一个自封容器（如干燥箱，参见图 4.11）补充 CO_2 气体，放置在一个恒温箱或者高温室。
2. 关掉已清空的恒温箱。
3. 移除恒温箱中所有支架、水盘和任何可安装的面板。用清洁剂清洗恒温箱里面，设法清洗所有角落和缝隙。
4. 清水清洗。
5. 用 70%乙醇擦拭恒温箱内部。
6. 恢复加热（无 CO_2），让门一直开着，直到恒温箱腔体干燥。

7．用清洁剂清洗支架和面板，清水洗涤，70%乙醇擦拭。
8．安装支架和面板至恒温箱中。
9．如果可以的话，运行灭菌程序，使恒温箱降温至正常工作温度。
10．重新放置水盘，注入含有2%四级铵化合物的无菌水。
11．关门，恢复CO_2通气。
12．当温度和CO_2浓度稳定后，将培养物品放回恒温箱中。

5.5.3 盒装培养物

当湿式恒温箱内的污染问题频繁重现时，把培养皿、培养板和松开盖子的培养瓶放在塑料盒里培养更为有利（图 5.11），使用前，要将盒子的里里外外进行擦拭消毒，然后在无菌空气中干燥。当从培养箱中取出盒子时，在打开并带入工作区前，要用70%乙醇擦拭，然后小心取出培养皿，并擦洗盒子内部以备再次使用。带有可透气性盖子的培养瓶（参见7.3.6节，图7.8b）不要求盒装，但在放到生物安全柜内之前要用70%乙醇擦拭。

5.5.4 充入CO_2气体

一般来说，操作时把松开盖子的培养瓶放入温湿CO_2培养箱中以进行气体平衡，但是，这样做确实增加了被污染的风险。现在，带有透气性盖子的培养瓶可以在5% CO_2气体环境中迅速达到平衡，但不会有被污染的危险。也可以往培养瓶内注入无菌的、预先混合好的气体（图 5.12），然后把培养瓶密封起来，这样避免了培养瓶对通气培养箱的需求，而且可使气体均匀一致，快速平衡，但放入培养箱或温室内15~30min后，培养瓶内的压力需要适当释放。

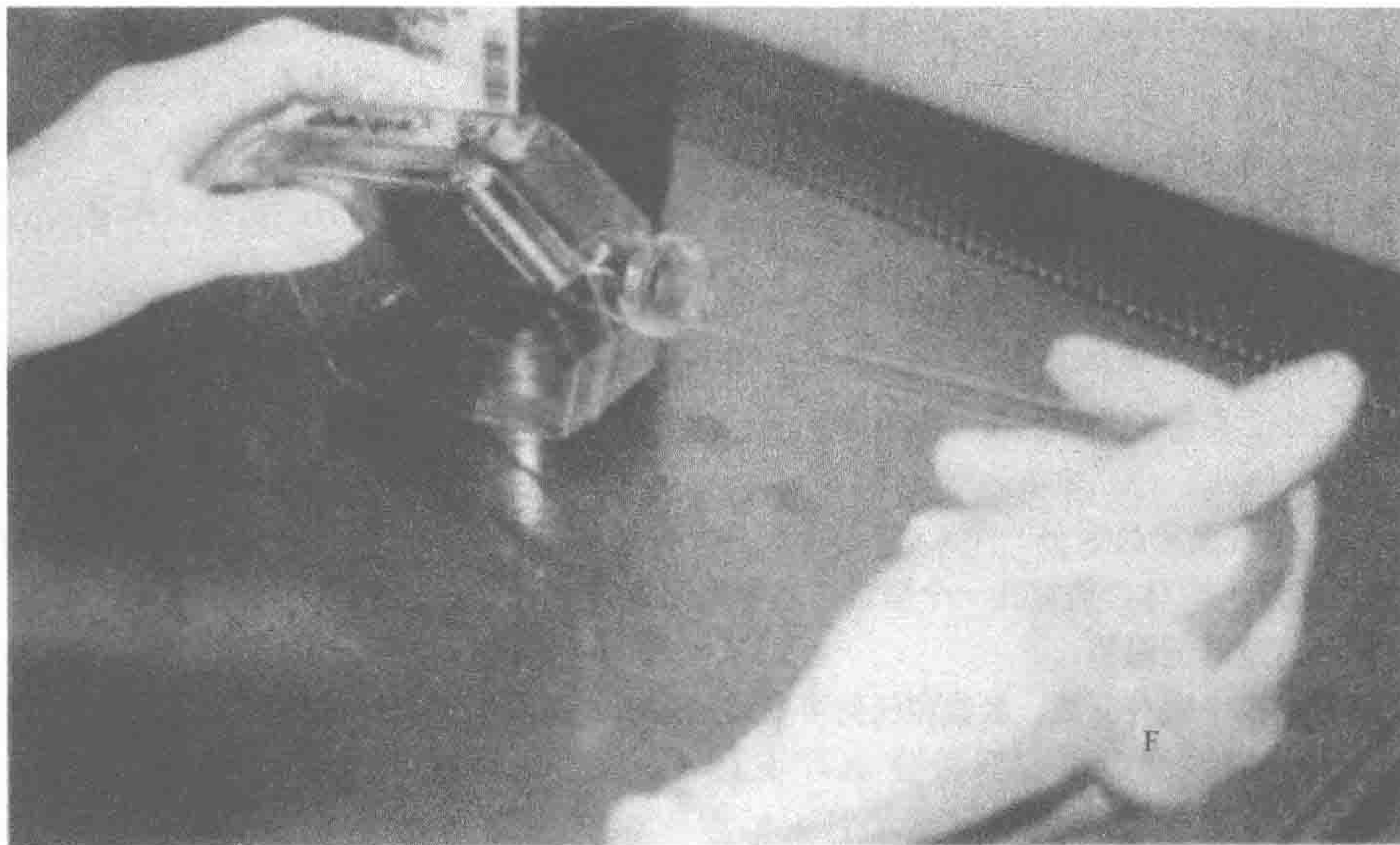


图 5.12 向培养瓶充气。将吸管插入CO_2供气管，充入的5% CO_2气体可以将空气冲到培养瓶外，所以培养基不会有气泡出现。字母F表示插入CO_2供气管的微孔滤器

参考文献

Balls M, Coecke S, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman LM, Stacey G, Stokes W (2006). The importance of good cell culture practice (GCCP). *ALTEX* **23**(suppl.):270–273.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W; Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. (2005). Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern. Lab. Anim.* **33**:261–287.

FDA (2006). Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing—Current Good Manufacturing Practice. Rockville, MDA: FDA, 2004. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070342.pdf.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, McDermott U, Marshall C, Masters JRW, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **9**(111):1021–1046.

McDonnell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:147–179 [corrected *Clin. Microbiol. Rev.* (2001) **14**:227].

Parker, R. C. (1938). *Methods of tissue culture.* London, Hamish Hamilton Medical Books, p 89, Fig. 23.

（徐存拴 译）

第6章

安全性、生物伦理及验证

组织培养实验室要执行与所有工作场合相同的安全和管理条例，但是也有一些根据工作性质制定的针对性规定。从小的基础研究团队到大型工业化企业，细胞培养的水平参差不齐。但遵守的安全管理原则基本上是一样的，管理调控的程度会随着工作环境有一定的变化。本章重点关注的是独立的科研型研究实验室，但也会考虑在工业化环境中的应用。本章给出的是一般性建议，不要认为它能符合所有国家或国际的法律要求。本章中提供的可供参考的正式规范和程序大部分来自美国和英国，正式指南的形成由个别机构来负责。

6.1 实验室安全

尽管大多从事细胞培养的人员都有扎实的科学根底，经过了有素的培训，但意外事故仍会发生。因为熟练常常导致用一种随意的方式处理常规的、生物的或放射性危害。此外，不是每个从事该领域的人员都是有科学背景的，责任在于那些训练有素的人员，他们应为所有在此工作的人们维持一个安全的环境。当然，能看出潜在危害很重要，但同时也不要过分强调危险，而要理性对待。如果不如实地看待危险，那么就不好采取合适的预防措施，整个安全操作规程将会流于形式。

对从其他部门或别处新来的加入组织培养机构的全体工作人员进行组织培养实验室安全方面的正规培训十分必要。这种培训也应伴随纸质文件的出台，向人们清楚阐明安全操作程序，以及个人和管理部门的角色。这样的指南也要涉及伦理问题（参见6.9节）和质量保证的重要方面（参见6.10节），以及对细胞系的可靠使用和组织培养实验室安全性的必要验证（参见6.10.3节）。该部门的新成员不论辈分都应被视为新手，直到他们郑重宣告能按照制定的实验室专业化规范化程序独立操作。

6.2 危险性评估

危险性评估是一项很重要的原则，已包含在现在大多数安全法规中。确定一种特定危险的性质和程度仅仅是评估过程的一部分，整体的环境条件在确定危险性方面很重要（表6.1）。诸如特殊材料的数量、接触危险的程度和频率、实验规模、材料处理和设备操作程序、操作人员及培训

情况和经验、人员数、个人防护装备的类型，以及暴露在高温、严寒和电流等环境中附加的危险性等都会引起在某一特定的危险，然而危险性的本质一样的。

表6.1 危险性评估要素

分类	危险性影响因素
操作者	
经验	水平；相关性；背景
培训	以前的习惯；新要求
防护服	合身；穿戴正确（扣好实验服）；定期清洗；磨损时修补或丢弃
仪器设备	
年限	状况；符合新法规
适合的工作	使用；样本容量；防范性
机械稳定性	载荷；锚固；平衡
电气安全	接线头；地线泄漏；靠近水
防范	气溶胶：产生、从防护罩管道泄漏、从工作区溢出； 有毒气体 排气管道：完整性、排气位置和下风的风险性
热	产生；散热
维护	频率；是否要净化？
处理	常规；是否要去污？
物理风险	
过热	影响操作者能力
极冷	冻伤；麻木
电击	失去知觉；心脏骤停
火	一般预防措施；设备的布线、安装和维护；电线附近水侵入；消防演习，程序及逃生路线；溶剂的使用和储存（如不要将乙醚存放在冰箱内）；可燃性混合物；储存的生物危害性物品和放射性化学品的鉴定
化学品（包括气体和挥发性液体）	
规模	使用剂量
毒性	有毒性；致癌性；致畸性；诱变性；腐蚀性；刺激性的；过敏性的；窒息性的
与水反应	产热；沸腾
与溶剂反应	产热；沸腾；产生易爆性混合物
挥发性	中毒；窒息
产生粉末或气溶胶	散播；吸入
运进、输出和转运	破损；渗漏
位置和存储	未经培训的人员进出；违规入内；天气；水侵入；稳定性；压缩；破损；渗漏
生物危害	
致病性	等级；感染性；宿主特异性；稳定性
规模	细胞数量；DNA 量
遗传操作	寄主特异性；载体的感染力；致残
防范	房间；通风橱；操作程序

续表

分类	危险性影响因素
放射性同位素	
辐射	类型；能量；穿透力；屏蔽；相互作用；电离；半衰期
挥发性	吸入；散播
掺入定位	DNA 前体物，如 3H 标记的胸腺嘧啶
处理	固体、液体和气体；途径；法律限制
特殊环境	
妊娠	免疫缺陷；对胚胎的危害；致畸性
疾病	免疫缺陷
免疫抑制性药物	免疫缺陷
切伤和擦破	增加吸入的危险
过敏	粉末（如洗涤剂）；气溶胶；接触（如橡胶手套）
操作要素	
规模	材料用量；仪器设备规模及对防范的影响；参与人员数量
复杂性	步骤或阶段多少；选项数量；交互体系和操作程序
持续时间	处理时间；孵育时间；储存时间
人员数量	增加危险性？减少危险性？
位置	防范；安全性和进入

在制定安全措施中，相对有毒的腐蚀性化学药品、溶剂、火、电离辐射、电击和碎玻璃等已知的且已被证实的危险来说，生物医学实验室常遇到的一个主要问题来自对于那些较难捉摸和较少了解的危害缺乏应有的关注，如来自遗传操作的危险。对生物危害性进行正确分类很重要（CDC，2009c；HSE，2014），既不要过于强调，也不要低估，而且预防措施不能代替对日常安全问题的注意。

6.3 标准操作程序

有害物质、仪器设备和环境条件不应该被认为是彼此孤立的，应该被视为某一程序的一部分。而一个操作程序的每个组成部分都应该进行评估。如果这个程序被认为带来了不同于平常的严重危险，那么应该对标准操作程序（standard operating procedure，SOP）加以定义。所有有害物质的使用者及仪器操作者都应该遵从这一标准程序。要区分开如获取、储存、操作和处理等操作程序的不同阶段，且还要考虑到在操作过程中多种危害同时出现的可能性，有必要采取更多的预防措施（如怎样处理接触了经放射性同位素标记的人细胞系的碎玻璃问题）。

6.4 安 全 规 则

不能把下面的建议理解成实施准则，而应看作帮助制定安全法规的建设性意见。这些信息旨

在为读者提供一些指导，以及有助于制定地方实施规则的建议，并与地区和国家的法规相衔接，与地方安全委员会有充分的协商（表6.2）。这些建议尚没有法律地位，即使将它们按法规使用也起不到法律效力。

表6.2 安全行为规范级别

分类	作用
管理机构	联系国家或地方检查员
地方安全委员会	委派代表；安排会议和讨论
指南	参阅地方和国家指南；否则，需要制定地方指南
标准操作程序（SOP）	明确，便于使用
防护衣	提供、清洗、确保穿戴正确
箱式运输	明确物理描述（如储存和包装）
防范水平	明确化学、放射性和生物防范水平，并提供合适的场所
培训	安排研讨会，监督管理
监测	自动感应探测器，测氧仪
检查	指派训练有素的人员检查仪器设备、操作程序及实验室
记录保存	安全员和操作人员作详细记录
输入和输出	调控和记录
废弃物分类处理	明确尖锐物品、放射性废弃物（液体和固体）、生物危害性物品、腐蚀剂、溶剂、毒素的处理流程
准入	仅限于训练有素的人员和访客；除公共场区域外，禁止小孩进入

一般的安全规则应该由你所在工作单位的组织安全办公室制定，还可以参照美国的《职业安全和健康管理》（OSHA，2014）及英国的《健康和安全工作管理法规》（1999）（表 6.3）。这些规则覆盖了一般安全问题的方方面面。有关生物安全性的规则和建议已载入美国《微生物和生物医学实验室生物安全》（CDC，2009a），这是由佐治亚州亚特兰大疾病预防控制中心，以及马里兰州贝塞斯达国家健康研究院共同制定的文件。在英国，生物危害性工作指南可从健康和安全执行委员会获取（HSE，2009）。在欧洲，安全指南由国家一级制定和执行，而每个国家的责任是确保所制定的安全指南合乎相关的欧盟指令。

表6.3 安全法规和指南

细目	美国	英国（一般与欧盟指令一致）
常规	《职业安全和健康管理》（OSHA，2009）	《健康和安全工作管理法规》（1999）
设备	《职业安全和健康管理》（OSHA，2009）	《工作设备的提供和使用条例》（HSE，1998）
化学	《职业安全和健康管理》（OSHA，2014） 《国家职业安全和健康研究》（CDC-NIOSH，2009）	《对健康有害物质的控制管理》[健康与安全委员会（HSE-COSHH）]
生物，包括遗传操作	《CDC NIH：微生物和生物医学实验室生物安全》（CDC，2009a）	《安全和健康部，工作感染及遗传修饰生物》（HSE，2014）；危险病原体咨询委员会（ACDP，2013）
放射性	《核材料的医学、工业和学术研究使用》（USNRC，2013）	HSE 辐射防护出版物（HSE，2000）

6.5 常规安全

在组织培养实验室，要特别注意某些常规性安全问题（表6.4）。

表6.4 组织培养实验室安全危害

分类	细目	危险	预防
常规	碎玻璃	伤害，感染	在指定容器中小心处理
	移液管	伤害，感染	检查玻璃移液管是否受损并丢弃；用塑料吸管
	尖锐器械	伤害，感染	小心处理；弃入锐器箱中
	巴斯德玻璃吸管	伤害，感染	小心处理；不要用于潜在生物危害性材料上；用塑料吸管
	注射器针头	伤害，感染	尽量少用或不用；弃入锐器箱中
	电缆	火，触电身亡，挂住，绊倒	检查连接是否完好；夹在一起，并固定在安全地点
	管道系统	渗漏，挂住，绊倒	检查并定期更换；固定在适当位置；远离过道
	钢瓶	不稳定，渗漏	固定在工作台上或墙上；用检漏仪定期检查
	液氮	冻伤，窒息，爆炸	戴面罩；穿实验服、戴手套，不要在液相中储存安瓿瓶；如果冻存物被淹没在下面，解冻时将其密封好
烧伤	高压蒸汽灭菌锅、烘箱、加热板	与设备接触 处理需要灭菌的物品	张贴警告语 提供手套
火	本生灯；火焰，尤其与乙醇有关的	着火，熔化损坏；烧伤危险	远离层流罩，不要放在壁橱或架子下；不要让灼烧的器械再接触乙醇
	手动高压蒸汽灭菌锅	烧干；内容物燃烧	安装定时器和恒温开关；确保安全阀门起作用
放射性	无菌操作柜中的放射性同位素	辐射，溢出，气溶胶，挥发性	在Ⅱ级或化学危害性通风橱的吸收托盘上操作；尽量减少气溶胶
	培养物的辐照	辐射剂量	使用监测器、携带个人徽章监测器、定期检查
生物学	细胞系和活检材料的引入	感染	不要从高风险地区引入；筛查培养物中可疑的病原体
	遗传操作	感染，DNA转移	遵守遗传操作指南
	病毒扩增	感染	遵守CDC或ACDP指南；在合适的防范水平上操作；尽量减少气溶胶
	生物安全柜的位置和维护	防范故障	定期检查气流模式、过滤器的压降情况及橱柜的溢出物

6.5.1 操作者

一般的研究机构有责任在有关实验室操作程序方面提供正确的培训，并确保新、老工作人员熟悉掌握安全规则，实验室主管的职责是确保操作程序的正确执行，并确保在适宜的时间穿戴合适的个人防护装备（如实验服、护目镜、面具、手套、套鞋或靴子）。

另外，确保工作地点、位置和工作姿势不会对操作者的健康造成不利影响也是研究机构和实验室负责人的职责。长时间坐在生物安全柜或显微镜旁需要有一个舒适的周围环境，还要求操作者的姿势不会受到糟糕的布局或极差的可调整性的影响。这时就需要配备可调座椅和脚凳，这样的话操作者在工作时会比较放松，而不会为了保持一个不舒服的姿势而全身紧张。多年前生物安全柜上坡形前缘的引入提高了工作效率。鼓励人员将工作安排在合适的时间段，这样他们每隔一定时间可以来回移动，并不断改变活动方式。

6.5.2 设备

应该指派一个总负责人负责所有设备的维护、电气安全、机械的可靠性；实验室管理员应针对某一独立的仪器设备负责，监督该仪器设备的维护和操作，做好适当的记录，并培训其他人员如何使用。特定风险包括在冰箱和匀浆器中有毒气体或气溶胶的产生，这需要通过选用合适的设备或将这些仪器置于通风橱中等方法来加以控制。

设备的电气安全性在美国由职业安全和健康管理局（OSHA）、在英国由健康和安全执行委员会（HSE，2013）管制。实验室管理员应该保证这些设备性能符合规定。

6.5.3 玻璃器皿和锐利物品

在组织培养中，最常见的伤害是玻璃破碎和注射器针头使用时引发的意外事故。移液管在洗涤缸内破碎尤其危险，其原因是过多的移液管挤在一个过小的容器内（图 6.1）。不能将巴斯德玻璃移液管和其他移液管一起插到一个洗涤缸内（参见本节下面部分）。针头与一般废弃物一块处理是不合适的，或当容器过满时，沿坚实的容器筒壁把物品硬塞进去也是很危险的。

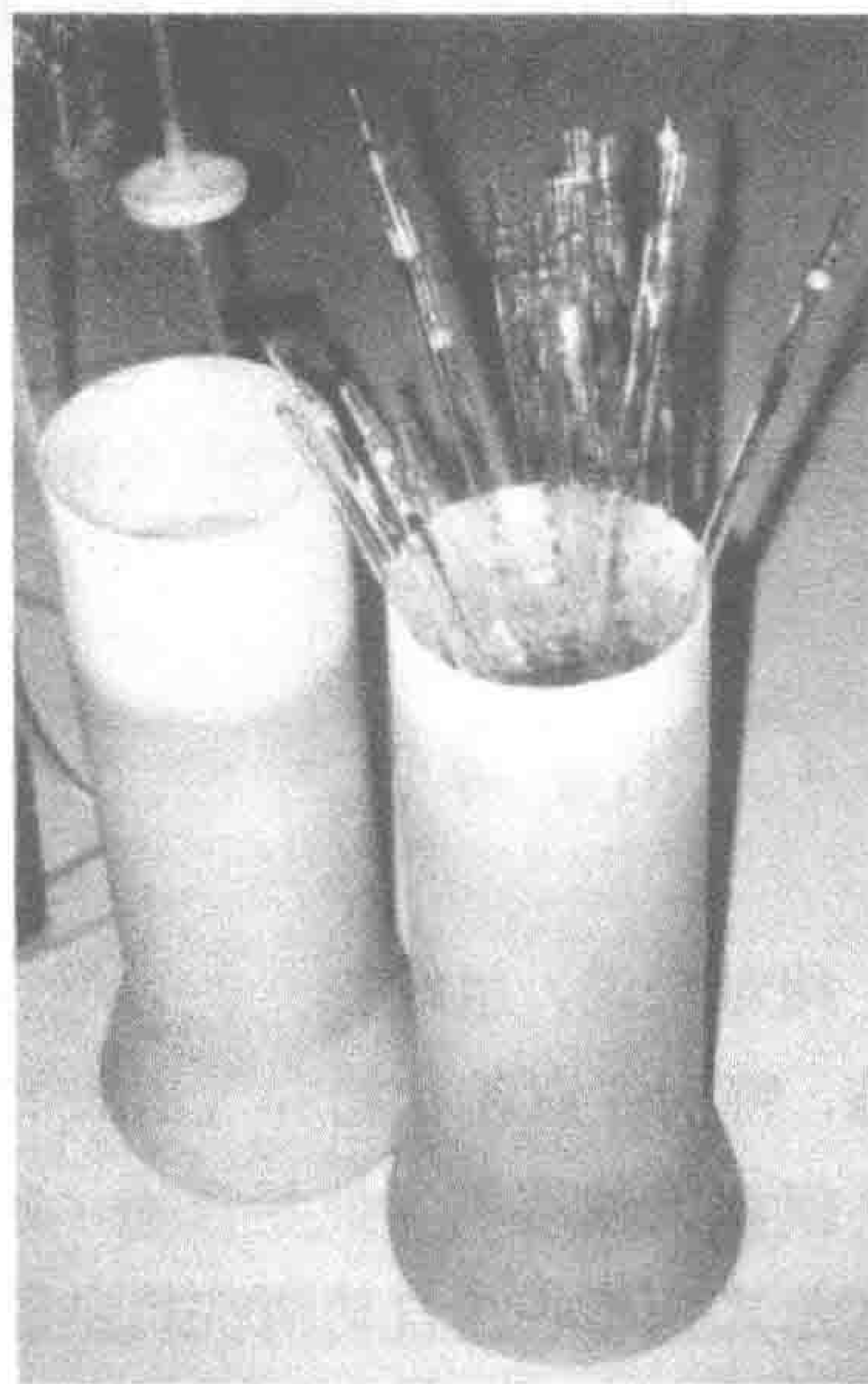


图 6.1 装载过满的移液管筒。将移液管硬塞进已装满的移液管筒会导致吸管被挤出，那些被挤到筒外的吸管就不能被浸泡或消毒，而且插入其他移液管时（若是玻璃的），很容易断裂

由废弃针头或破碎玻璃引起的，或常规操作中一个偶发事故引起的意外接种仍然是在处理潜在生物危险材料时遇到的严重风险之一。在治疗人类肿瘤时，尤其对那些无免疫缺陷的患者来说，会带来移植风险（Southam，1958；Scanlon et al.，1965；Gugel and Sanders，1986）。

应该将巴斯德玻璃移液管丢进锐器桶里（参见补充材料附录Ⅱ）（CDC/NIOSH，1998），由于巴斯德玻璃吸管极易破碎，且碎片危害极大，因此不要用常规方法清洗。如果重新使用，对它们单独处理时要格外小心。现在有一次性塑料巴斯德移液管（如 Pastettes）可以使用，但其吸头往往比较厚。由于巴斯德或其他一次性塑料移液管不能重复利用，因此应该与玻璃移液管分开进行废旧处理，并在处理前进行净化去污。在处理前它们不能再套上塑料包装。

如果不是给安瓿灌注（用钝的插管）或从带帽的小管内抽取液体，那就不要用带针头的注射器。使用带针头的注射器时，要缓慢小心地拔出针头，同时针头和针鞘要指向远离自己的方向。丢弃一次性针头时，不用把它们弄弯、把玩或重新加鞘，要把它们弃存在专门为锐利器械和碎玻璃提供的硬塑料或金属垃圾箱内，不要用这些垃圾箱收集一般的废弃物。

当把吸管装入洗耳球或移液装置上时要小心，并选择大小合适的洗耳球以防吸管从管颈处断裂划伤手。需检查管颈是否完好，尽量固定住移液管靠近末端的部分，轻轻压迫指向远离关节方向的移液管（图6.2）。虽然危险主要出现在使用玻璃移液管时，但在插入洗耳球时，塑料吸管也会受损甚至破裂，因此使用前要检查每个移液管顶部的完好性。

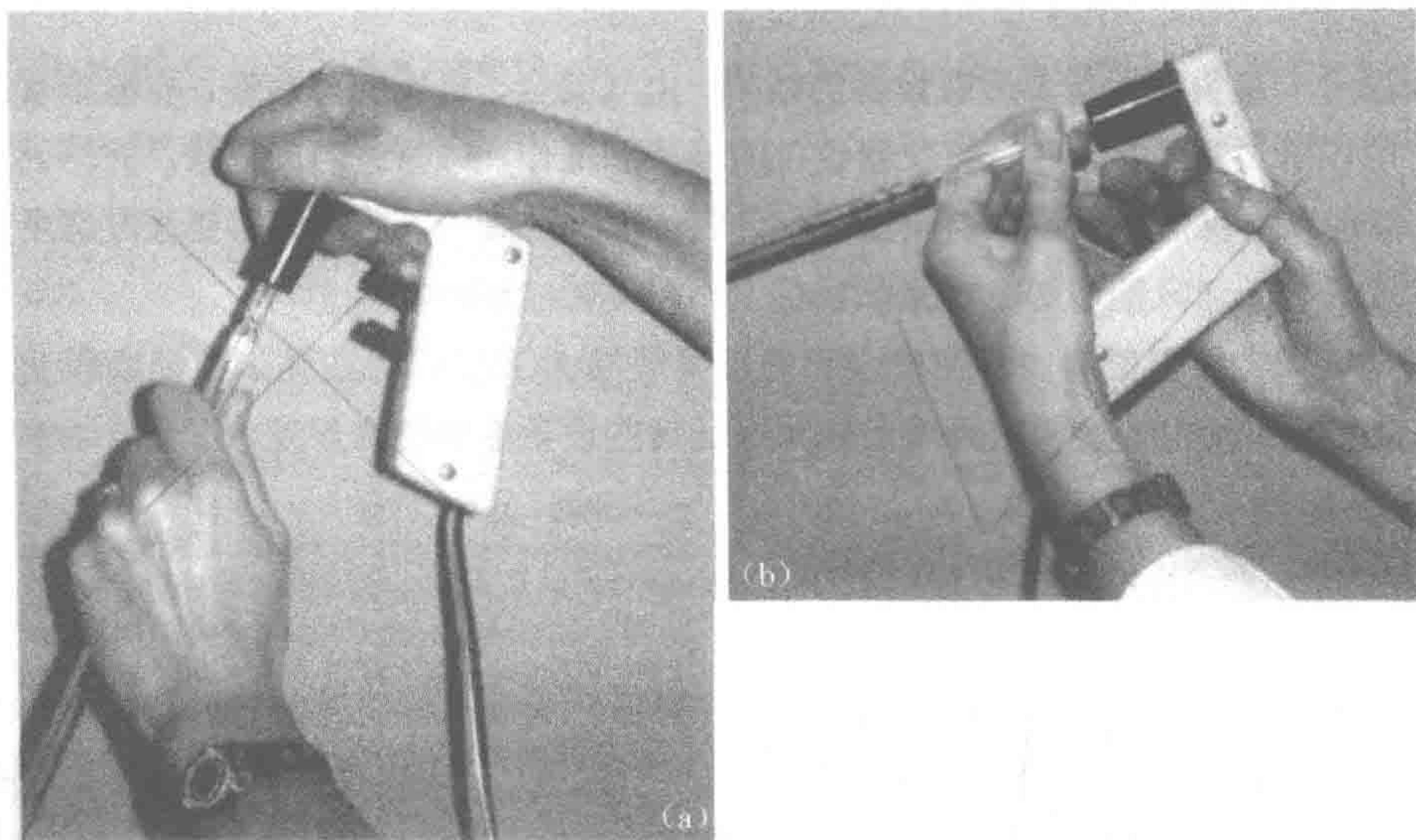


图6.2 安全地将移液管插入移液装置内。（a）错误的位置：左手太靠近移液管下部，有污染移液管的危险，插吸管时用力太大，会使移液管破裂；右手离得太开，暴露在移液管末端，插入过程中会使移液管从颈部断裂；用左手臂持移液管口也不可取，会有因接触未灭菌表面而造成污染的危险。（b）正确的位置：左手靠近移液管上端并轻握移液管，右手避开移液管顶端，清楚看到移液管的尖端

6.5.4 化学毒性

相对来说，组织培养中用到的毒性物质很少。但是，当用到毒性物质时，应采用常规的预防措施，特别注意粉状物和气溶胶的散布。在维护妥善的生物安全柜内工作时需要给出一些保护措施，但如果使用剧毒性复合物，则需要一个全排式Ⅱ级B2型生物安全柜（参见6.8.2节）。去污剂，尤其是那些在自动清洗机中使用的去污剂，一般具有腐蚀性，即使没有腐蚀性，也能刺激皮肤、眼睛和肺。对分液装置尽量使用液体去污剂，戴手套，避免粉状去污剂像灰尘一样扩散。液体去污剂浓缩液更方便于使用，但要达到同样的去污效果一般花费更多。化学消毒剂，如次氯酸盐，不管是片剂还是经分液器分装的液体，使用时都要小心，因为次氯酸盐消毒剂能漂白衣物、刺激皮肤，甚至腐蚀焊接的不锈钢。

组织培养中，需要特别注意的特殊化物质包括：①二甲基亚砜（DMSO），这是一种强溶剂

和皮肤渗透剂，能促进许多物质透入皮肤（Horita and Weber，1964），甚至能穿透一些防护手套（如乳胶手套或硅胶手套，但极少能通过丁腈手套）；②诱变剂、致癌剂和细胞毒药物，这些物质需要在Ⅱ级 B2 型生物安全柜中处理（图 6.5b）。诱变剂、致癌剂和其他有毒化学物质有时需要溶在 DMSO 中，这样会增加通过皮肤吸收的危险。丁腈手套可提供有效的屏障，但用于特殊试剂时应加以检查而且要带双层手套。

化学试剂的使用和处理由美国职业安全和健康管理局（OSHA，2014）及英国健康和安全执行委员会（HSE-COSHH）来规范。相关信息和指南也可从国家职业安全和健康研究所（CDC-NIOSH，2014）获取。

6.5.5 气体

组织培养中使用的大多数气体（二氧化碳、氧气、氮气）用量较小时并没有危害，但如果处理不当也会有危险，应把它们装在有安全保障的加压钢瓶中（图 6.3）。如果发生大的泄漏，二氧化碳和氮气将会有使人窒息的危险（通过氧剥夺方式），氧气会产生火灾隐患。不论哪种情况，必要的措施是疏散人员和加强通风。如果发生氧气大量泄漏，要通知消防部门处理。在大量储存或管道供应氮气和二氧化碳的房间的近地面处应该设置一个氧气检测器。

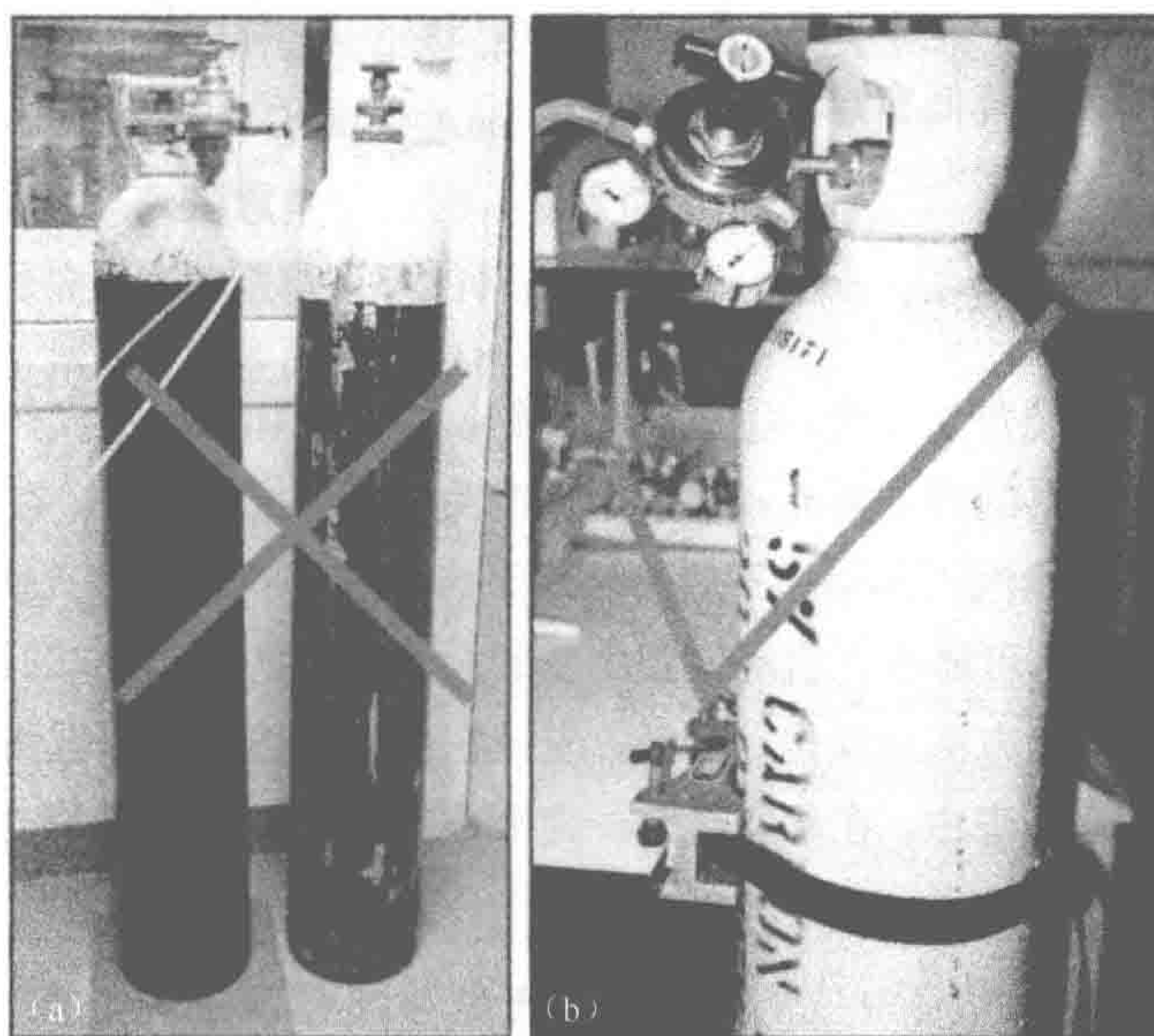


图 6.3 气体钢瓶夹具。放置气体钢瓶时必须用安全夹和带子加以固定。(a) 错误的放置：没有配安全夹和带子的钢瓶；(b) 正确的放置：钢瓶被夹在工作台边缘，用织物带缚住气瓶加以固定以确保安全。同时显示出瓶颈口的位置以利于保护钢瓶阀门。固定夹和带子适合各种尺寸的钢瓶，以便必要时移换钢瓶的位置；钢瓶可从大多数实验室供应商购得

当使用玻璃安瓿时，瓶子要用氧炔焰封口。要特别注意用火安全及防止气体和氧气意外混合，应在输气管上安装一个单向阀，防止氧气回流。

6.5.6 液氮

与液氮有关的主要危险有3种：冻伤、窒息和爆炸（参见方案15.1、方案15.2）。由于液氮的温度是–196℃，因此与液氮直接接触（如液氮溅出等）或与浸在其中的任何物体（如金属制品）接触均会出现严重冻伤。往往会低估冻伤出现的速度或者此温度下皮肤黏附在金属表面的速度。这时必须戴上厚手套以起到隔热作用，而且手套要有足够的柔韧度（如冷冻防护手套，BOC，Tempshield；另见补充材料附录III），以方便拿取安瓿。在冷冻箱常规使用中有液氮蒸发时，适时通风就可以排出多余氮气，但在液氮分装时，或需要将大量材料放进冷冻箱时，必须加强通风。记住，1L液氮可产生700L氮气！所以要安装一个氧气检测器和警报器（参见图3.8），并使其与通风系统连接，所以即使一滴引起氧浓度降低的液氮溅出物也会扳动报警器，增加通风换气量。

当把一个小瓶浸入液氮中时，安瓿瓶内外两侧会产生大的气压差。如果小瓶密封不好，液氮可进入瓶子内，当升温解冻时，小瓶内的液氮会迅速气化，产生剧烈爆炸。因此，放入液氮的小瓶必须密封完好，储存于液氮的小瓶解冻时一定要在一个带盖的容器中进行，如塑料桶（参见方案15.2，图15.8），而且要戴面罩或护目镜。若用玻璃安瓿，这个问题尤其严重，而使用塑料冷冻管时这类危险也会出现。可以通过将小瓶或安瓿瓶存放在气相中或恒温冷冻箱中的方法避免该类问题的发生，当然也可以降低窒息的危险。

6.5.7 烧伤

引起烧伤的危险源主要包括3类：①高压灭菌锅、烘箱和加热板等产热设备；②从高压灭菌锅、烘箱和加热板中刚取出的各类物品；③本生灯产生的明火（表6.4）。在移走所有物品之前必须留有足够的时间使高压蒸汽灭菌锅和干燥箱冷却下来，这样有利于被灭菌的各种物品的安全，有利于保护操作者的安全。可通过在自动装置中安装一个定时锁设置冷却时间，但对于手动操作的设备，必须要严格按正确方法来操作。最后，应该在所有产热设备附近张贴警示标语，并将设备使用的起止时间填写在附表中，在拿取之前一定要估算出其必需的冷却时间。在取放高温物品的地方一定要准备隔热手套。

6.6 火

专门与组织培养有关的火灾隐患源自使用本生灯灼烧及相伴行的乙醇擦拭消毒。为防止发生火灾，要把灼烧和乙醇消毒分开进行，尽可能用少量的乙醇对设备消毒，并装在不易翻倒的细颈瓶内（图6.4）。用于擦拭的乙醇应装在塑料洗瓶内或喷雾瓶内，不能在有明火的地方使用。当器械用乙醇消毒时，要让乙醇逐渐挥发掉，一定要注意不要在器械还在灼烧时又用乙醇重新擦拭。如果自己正用这种方法，一定要在旁边准备一块湿布用于乙醇燃烧时扑灭火焰。

6.7 电离辐射

与组织培养有关的辐射危害主要有3类：摄入、标记试剂的辐照和高能源辐照。相关的放射防护指南可从美国核管理委员会（USNRC，2013）或英国HSE辐射防护出版社（HSE，2000，2001）获得。

6.7.1 摄入

溅到手上的或通过移液管及注射器形成气溶胶的可溶性放射标记化合物有可能被摄入体内，如果意外摄入了含氚的核苷酸，它们会掺入DNA中，由于来自 ^{3}H 的低能量β射线光程短，可导致DNA辐射裂解。碘放射性同位素会聚集在甲状腺中，可能引起局部损害。

必须在一个能控制气溶胶的Ⅱ级A2型或B1型生物安全柜中工作，而且要戴手套。所使用的物品要放在一个铺有纸巾或Benchcote（如Capital Analytical或Camlab）的浅层托盘中，以吸掉意外溢出物。尽量使用合适的小型器械（如用带一次性塑料吸头的移液器、小试管等）完成操作，当弃入放射性废物容器内时，它们只占用最小的体积。工作结束后，认真清理现场，并定期检查工作区内有无溅出物。还要进行擦拭检测（如擦拭检测操作程序，2012），即用一个小棉签通过擦拭的方法对工作区取样，然后将棉签置入闪烁计数器内计数。

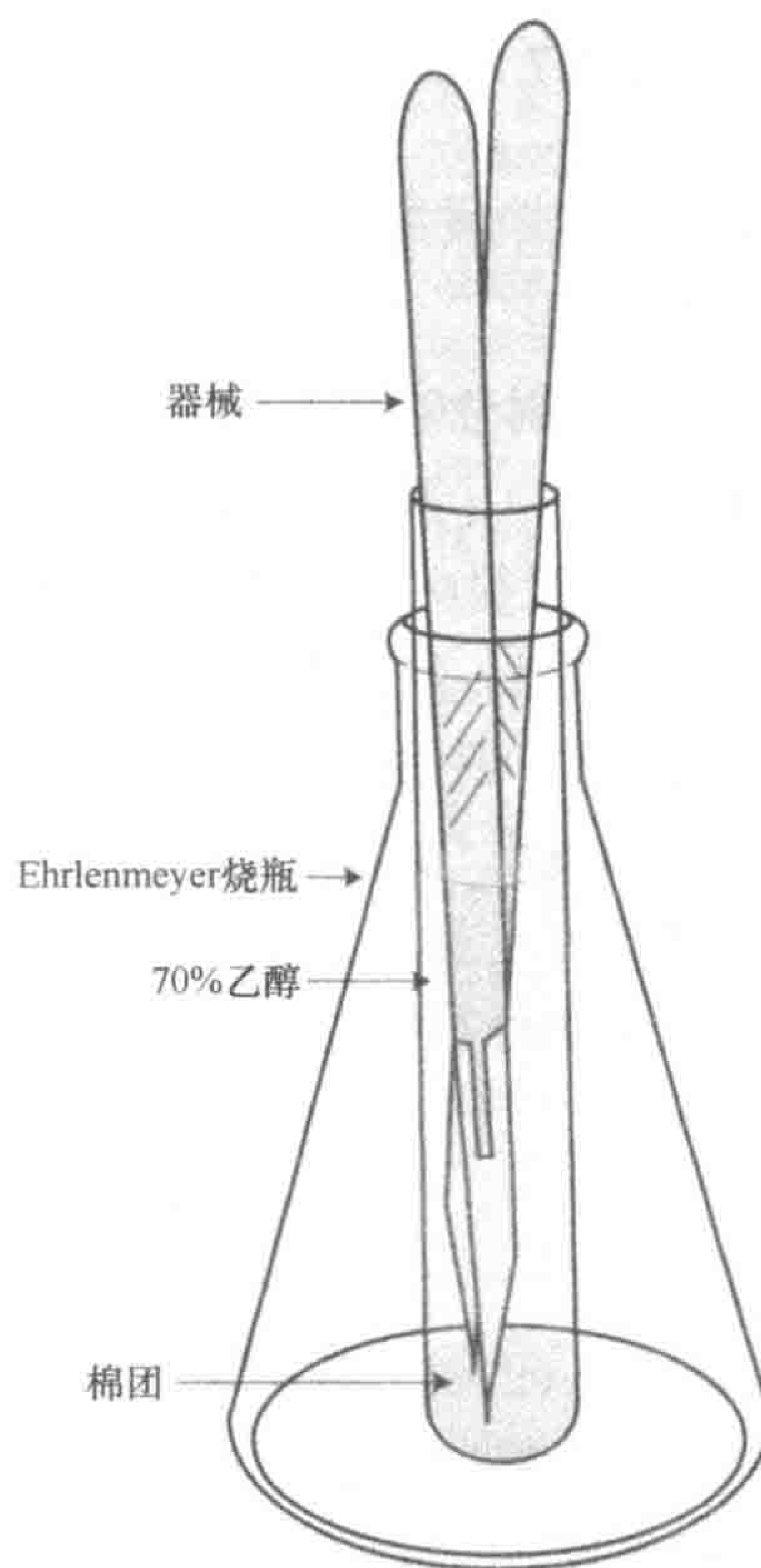


图6.4 用来进行乙醇消毒器械的长颈瓶。宽底座可防止倾斜，中央试管可减少乙醇的使用量，因此如果有乙醇溢出，量也极少（来于M. G. Freshney的设想）

6.7.2 放射性废物的处理

地方性实验室管理条例中对放射性废弃物处理的程序和方法有明确规定；这些条例应由美国USNRC和英国HSE等部门提出和制定。总之，在一定时期内处理的放射物量应有一个最大限度，并且要在专门设计的槽中处理，废弃物的量需要记录在工作日志处置一栏中。用于废弃物处理的器皿用合适的去污剂净化，然后再清洗除去放射性废物。处理过程要考虑到任何一种可能的生物危害，所以可重复利用的物品首先用次氯酸盐进行生物净化处理，再用Decon或类似的去污剂进行放射性去污。使用后，这两种溶剂就被视为放射性废弃物处理。

6.7.3 标记试剂的辐照

第二类辐射危害来自高能量 β 和 γ 辐射源的辐照，如 ^{32}P、^{125}I、^{131}I 和 ^{51}Cr。防护办法是在2mm 厚的铅屏后面工作，把浓缩的同位素储存在铅罐中。有机玻璃屏（5mm）可用来短期防护来自低浓度 ^{32}P 的辐照。使用同位素标记试剂的实验应在Ⅱ级 A2 型或 B1 型生物安全柜的托盘中进行（参见 6.7.1 节）。

6.7.4 高能源辐照

第三类辐射危险来源于 X 射线，高能源如 ^{60}Co，以及用于消毒器具或抑制饲养层细胞增殖的紫外线（UV）（参见 16.2.3 节，方案 25.1-Su、25.4-Su、25.28）。由于能量，尤其来自 X 射线或 ^{60}Co 的能量很高，常把这些辐射源置于专门设计的房间内，并进行严格监控。紫外线能烧伤皮肤和伤害眼睛，应严格屏蔽紫外线源，以防止紫外线对操作者的直接辐射，同时，操作者要戴上紫外线滤过护目镜。

在开始放射性同位素实验之前，应咨询当地的放射专员并学习操作规则。虽然各地的地方性法规不一样，但大多数地方都对放射性同位素的用量、储量和废弃量有严格限制。打算从事放射性同位素实验的人员在开始工作前，要求必须做如血样采集等方面的一般性医学检查。

6.8 生物危害性

许多专业学术网站都会展示生物安全管理，以及生物废弃物运输和处理相关指南，所以如果你正在编写自己的指南，而你所在机构或公司假设还没有选好合适场所，通过上网搜索去寻找一个附近合适的场所是一个不错的开始。

在放射性同位素使用方面，那些打算使用潜在有害生物材料的人员要求必须做一个初步的医学检查，包括血样储存。根据材料来源和操作方式来制定防范生物危害性的相关措施。同时，相关措施的制定内容还受培养物培养环境的影响。在开放的工作台上使用标准的微生物技术有其优势所在，即目前使用的技术是在多年经验积累的基础上建立起来的。当新技术被引进或当共用同一工作区的人员增加时，问题就会出现。水平式层流柜的使用能更有效保护培养物的无菌性，但会增加操作者在气溶胶中暴露的机会。这样促使了前面带有气幕的垂直式层流柜的出现（参见 5.2.1 节、6.8.2 节），从而将来自柜内的溢出降至最低程度。这种垂直式层流柜现在被称为Ⅱ级生物安全柜（参见 6.8.2 节）。

6.8.1 生物防范水平

美国国家卫生研究院（NIH）及疾病预防控制中心（CDC，2009a）将生物安全水平划分为 4 级（表 6.5），内容涉及操作规程及所需的设备和安全操作程序。虽然英国的法规指南同样把生物

防范水平分为 4 级，但与美国的分类方法稍有不同（表 6.6）。这些表格只是提供了部分要点。任何一个从事潜在生物危害性工作的人员应当咨询当地安全委员会，以及相关的国家行政机构（例如，CDC，2009a；HSE，2014）。

表 6.5　US 生物安全等级

	BSL 1（SMP[a]）	BSL 2（SP[b]）	BSL 3（SP）	BSL4（SP）
出入	操作过程中限制进入；大部分工作在开放式工作台上进行；防止昆虫和啮齿类出没；适用于大多数实验室	易染病体质评估；要求免疫、基础及周期性血清样品采集；中等潜在危害；张贴显示为 BSL2 的危险警告语	BSL 2+带有两套自动关闭门的独立实验室；控制出入，负压气流，空气全部排出不再循环。工作时关闭房门。 要求进行免疫或测试，并进行基础及周期性血清样品采集。 由一个有能力的科学家进行专门培训。 通常在 II 级 BSC 中工作。 对废弃物和用过的防护衣消毒	BSL 3+指定的工作人员；安全带锁的门。 更换空间和淋浴；门联锁装置。 设备和材料需经过双端高压灭菌锅或熏蒸才能进入。 除了正在进行的工作所需要的，其他材料一律禁止进入
清洁	易于清洁；橱柜、设备之间留有空间；防渗台面	BSL 1+工作台面及设备的常规净化	BSL 2+建议在有塑料背衬的吸水纸上进行操作；所有空间表面被密封并可以清洗	BSL 3+连接处密封；管道上的消毒器；通风口处的 HEPA 滤器；尽量减少工作台面上的灰尘
个人卫生	穿实验服；不吃饭、喝水；不用嘴移液；戴手套和防护眼罩（尤其是戴隐形眼镜时）；用来洗手的水槽；离开时摘掉手套并洗手；洗眼设备	BSL 1+净化设备供给及房间清洗	BSL 2+在 BSC 外侧戴护目镜、口罩或面罩；当无法控制气溶胶产生时需要呼吸保护装置；前固体罩衣，离开实验室前脱去；水槽上的自动或肘型水龙头	BSL 3+更换衣服；衣服经过高压蒸汽灭菌；离开前淋浴
气流与通风	未特别规定； 打开的窗户要有纱窗	同 BSL 1	窗户关闭并密封；负压；全部外排、远离工作区或进气口排气	专门的、装有报警系统的非循环通风系统；通过 HEPA 滤器排出空气；供气和排气相互交错
设备	未特别规定	定期净化，尤其进行房内或室外维护之前	BSL 2+物理封闭（如密封离心机盖和转子）；任何排放的气体经 HEPA 过滤。 真空线管受消毒器和 HEPA 滤器保护；防倒流装置	同 BSL 3
锐器物	未特别规定	只限于必要的使用，将用过的或破损的锐器物弃置专用容器中；处理之前要去污	同 BSL 2	同 BSL 2
BSC	不需要，但要尽量减少气溶胶	II 级	II 级或III级，由 HEPA 滤器直接排气；II 级可以再循环空气	配有正压工作服和生命支持系统的III级或 II 级 BSC
消毒	消毒剂可用；工作台面每天至少消毒一次	BSL 1+规定的操作程序；旁边有高压蒸汽灭菌锅	BSL 2+由训练有素的人员处理泄漏物	BSL 3+双端出口高压蒸汽灭菌锅（偏向于III级 BSC）

续表

	BSL 1（SMP[a]）	BSL 2（SP[b]）	BSL 3（SP）	BSL4（SP）
储存与转移	未特别规定	防漏容器	同 BSL 2	通过浸泡池或烟熏，用双层包装且不易破碎的容器放置活的材料
处理	放入消毒剂中或用密封容器放入旁边的高压蒸汽灭菌锅中	BSL 1+明确的去污方法	BSL 2+实验室消毒	BSL 3+除淋浴和厕所之外的其他所有废水，其他材料在离开前用双端高压蒸汽灭菌器消毒。 对于不能高压蒸汽灭菌的水来说用双端净化脱脂槽灭菌
生物安全手册与培训	未特别规定	要求培训	同 BSL 2	BSL 3+SMP 的熟练掌握
事故和泄漏	未特别规定	书面报告；有效的医学评估	BSL 2+由训练有素的人员处理泄漏物	BSL 3+监测缺漏、疾病护理及检疫
设备验证	未特别规定	未特别规定	未特别规定	废水的安全性

a 表示标准微生物操作

b 表示特殊操作，涉及适度潜在危险的处理试剂

表 6.6 UK 生物防范水平

	1级	2级	3级	4级
出入	工作时关闭房门	限制入内	2级+带观察窗的独立实验室。 不用实验室时锁门	3级+防止昆虫和啮齿类出没。 更换空间和淋浴；门联锁装置。 为仪器设备、电话或对讲机安装空气锁
空间	未特别规定	$24m^3$/人	同2级	同2级
清洁	易于清洁；防渗台面	1级+工作台面的常规消毒	同2级	同2级
个人卫生	实验服（拉锁或背部系带）的穿戴、存放、清洗、更换正确。 不吃饭、喝水等。 不用嘴移液	1级+出口旁放置洗脸盆清洗双手	2级+戴手套；在使用电话等公共设备时要拿掉或更换手套	3级+更换衣服；衣服经过高压蒸汽灭菌。 离开前淋浴
气流	最好是负压	要求负压	同2级	≥70Pa 负压（7mm H_2O）；连续用两个 HEPA 滤器排气；供气和排气相互交错
设备	未特别规定	未特别规定	包括特有的设备	必须包括特有的设备
BSC	不需要，但要尽量减少气溶胶	要求 BSC 或隔离装置	Ⅰ级或Ⅲ级（BS5725）；Ⅱ级（BS5726）。 通过 HEPA 滤器直接向外排气	Ⅲ级

续表

	1级	2级	3级	4级
消毒	有效的消毒剂	规定的操作程序；旁边有高压蒸汽灭菌锅	2 级+可密封的实验室以便于清洗；实验室内最好放置高压蒸汽灭菌锅	3 级+双端出口高压蒸汽灭菌锅（偏向于Ⅲ级 BSC）
储存	未特别规定	生物试剂的安全存放	同2级	
处理	放入消毒剂中	BSL 1+被标记的废弃物；安全收集及处理	同2级	3 级+所有废水，包括淋浴和洗手间。 对于不能高压蒸汽灭菌的水来说用双端净化脱脂槽灭菌
意外事故	报告	同1级	同2级	3 级+出现危机时需要有第二个人的协助。 外面放有呼吸防护口罩
设备验证	未特别规定	未特别规定	未特别规定	需要

6.8.2 生物安全柜（BSC）

生物安全柜分为如下3个标准级（表6.7）。

（1）Ⅰ级生物安全柜，全排式，用于保护操作人员的安全，但对所处理的材料起不到无菌保护作用。因此这类生物安全柜不适合用于组织培养。

（2）Ⅱ级生物安全柜，具有HEPA过滤后的空气进气口。一个垂直层流柜的前窗操作口能向内吸入空气，用以保护操作人员的安全；柜内气流经高效空气过滤后排出，从而保护环境安全（BSC，Ⅱ级，图6.5）（NSF/ANSI 49，2008；英国国家标准 BS5726—2005）。A1型生物安全柜前窗操作口流入气流的最低速度是75ft/min，而A2型、B1型和B2型生物安全柜则为100ft/min。Ⅱ级A型生物安全柜内70%气体通过HEPA再循环至工作区，而Ⅱ级B型柜内再循环的空气只占30%。Ⅱ级B2型安全柜内的空气不再进入循环过程，而是通过HEPA过滤后全部排出室外大气中。Ⅱ级A1型柜内通过排气口HEPA过滤后的空气可以排到实验室内。但

表6.7 生物安全柜

等级	气流速度		空气入口	再循环	排气	
	ft/min	m/s			排向	过滤器
Ⅰ	75	0.4	前面	否	房间或室外	HEPA
ⅡA1	75	0.4	前面	70%	房间或室外	HEPA
ⅡA2	100	0.5	前面	70%	房间或室外	HEPA±病原体捕捉滤器
ⅡB1	100	0.5	前面	30%	经专用管道排向外部	HEPA±病原体捕捉滤器
ⅡB2	100	0.5	前面；顶部经过预过滤器和HEPA过滤	否	经专用管道排向外部	HEPA±病原体捕捉滤器或活性炭
Ⅲ	—	—	顶部经过预过滤器和HEPA过滤	否	经专用管道排向外部	HEPA+病原体捕捉滤器

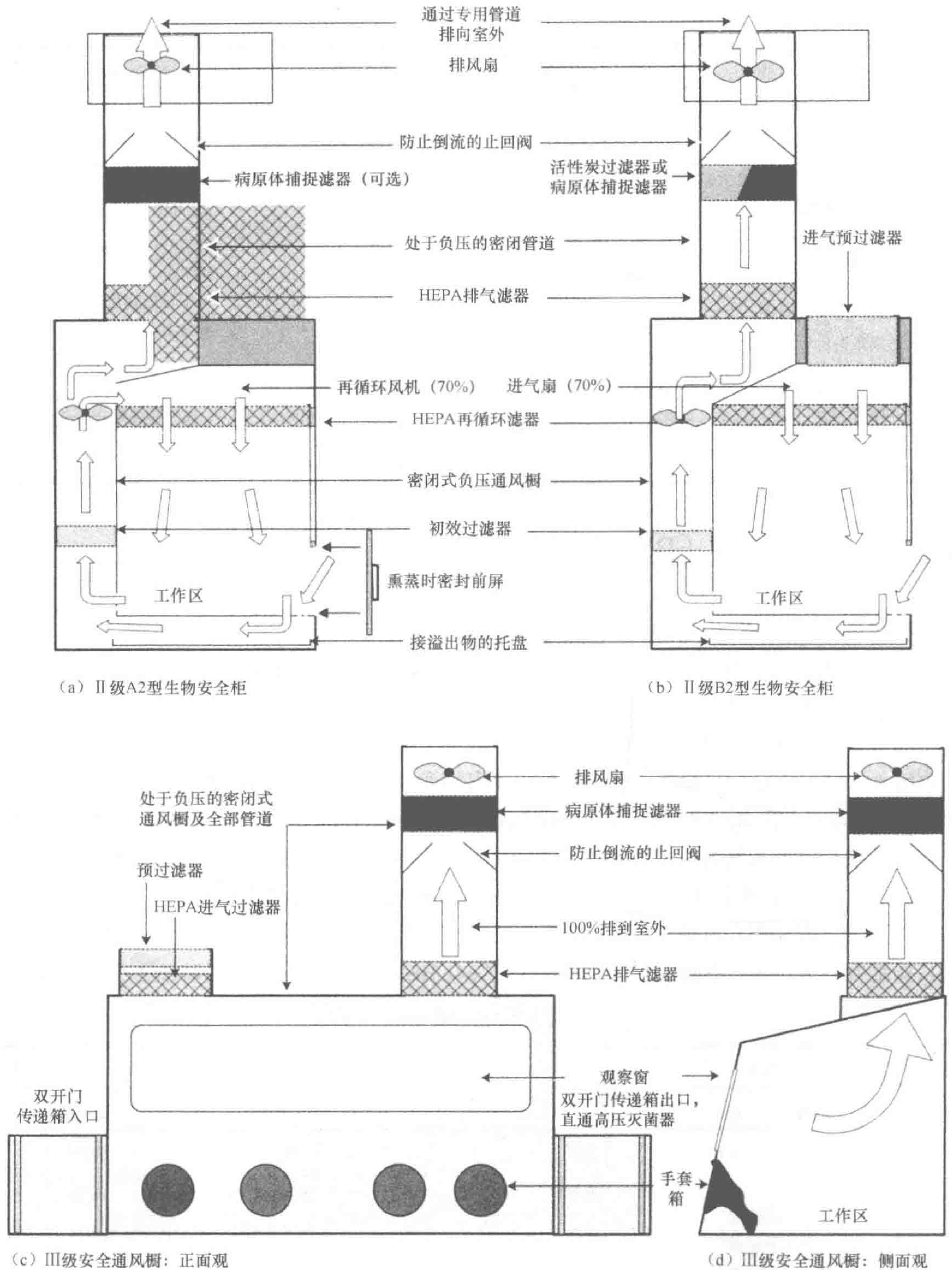


图 6.5 生物安全柜。（a）Ⅱ级 A1 型生物安全柜，70%空气进行再循环，30%气体经过滤后通过病原体捕捉滤器排到室外。空气从安全柜前操作口进入，以补充循环的气体量，并防止气体从工作区溢出；（b）Ⅱ级 B2 型生物安全柜，排气口带有活性炭滤器，空气不参与再循环；（c）Ⅲ级非再循环的手套箱式全封闭生物安全柜。负压下工作，设备入口处有空气锁，直通高压灭菌锅，相连或相邻；（d）Ⅲ级生物安全柜的侧面观

Ⅱ级 A2、B1 和 B2 型安全柜内的气流经过 HEPA 过滤后通过排风管道排到外界大气中。

（3）Ⅲ级生物安全柜，具有 HEPA 过滤后的空气进气口。柜内气体单向流动，不参与柜内循环，经过 HEPA 过滤器和病原体捕捉器过滤后排出。工作人员双手通过手套操作口伸入柜内进行操作；实验材料通过双门的传递箱送进柜内。

在合适的防范水平内，我们可以根据使用的生物安全柜类型将防范处理分为 3 个层次（另见 CDC，2009b）。

（1）最低防范。依赖优良微生物学技术的开放式工作台。实验操作通常需要在一个专门指定的区域进行，可简单定义为“组织培养实验室”，但它必须达到 1 级环境水平。

（2）对潜在危险的中级水平的防范。如果没有理由认为实验材料不会被外源性物质感染，那么就要将Ⅱ级生物安全柜安放在被列为Ⅱ级防范水平的、出入受到严格限制的主要组织培养实验室内。在该区域废弃物处理受到管制，必须穿防护衣，而且不能进食或饮水（表 6.5，表 6.6，表 6.8）。所有的防止生物危害装置都必须严格遵从保养要求（Osborne et al.，1999），定时检验过滤器；在更换过滤器前，要对通风橱进行适当的熏蒸；对旧过滤器进行安全处理的方法是将它们放入双层袋内焚烧。如果处理的是已知的病原体，Ⅱ级 A2、B1 或 B2 型安全柜应该单独放置在一个房间内，并根据病原体的性质，选用 2 级、3 级或 4 级的防范水平。所有的生物安全柜都要有一个严格的保养和维护程序（Osborne et al.，1999），并且定期检查过滤器，在更换过滤器前，要对安全柜进行适当的熏蒸；对安全处理旧滤器的方法是将它们放入双层袋内焚烧。

（3）对已知病原体的最高级水平防范。要求配置一个密封的病原体通风橱，进出通风柜的空气已经过病原体捕获滤器的过滤（Ⅲ级生物安全柜）（图 6.5c）。通常把通风橱安装在一个单独的房间内，出入房间需受严格限制，根据危害性质不同，需要安装淋浴设备和防护固体及液体废弃物的设施（参见表 6.5 中的 BSL 4 和表 6.6 中的 4 级）。

表 6.8 列出了在建议的防范水平内的一般操作规程。然而，所有使用这些设备的人员都应向当地安全委员会咨询，以获得适当的合乎法规的防生物危害指导（参见 6.4 节）。

6.8.3 人体活检材料

使用已知分类的病原体时，生物安全性问题最清楚，因为美国人类健康服务局（CDC，2009a）和英国危险病原体咨询委员会（ACDP，2013）制定的条例中涵盖了这样的病原体。然而，在两个领域中危险性不会立即显现在实验材料性质上。一个是由转染、反转录病毒感染和种间细胞杂交等重组技术导致新的潜在致病性基因的出现。在层流柜中处理此类培养物时，往往会带来无流行病学资料可供参考的潜在危险，所以必须在 2 级防范水平（UK level 2）上的Ⅱ级生物安全柜内进行。转化的病毒、双向性病毒、转化的人类细胞系、人-鼠杂交种及免疫缺陷小鼠中源自异种移植的细胞系等均应谨慎处理，直到有足够的资料证明它们不再有危险性。

另外一个危险领域包括人和其他灵长类活检或尸检样品或细胞系中（Grizzle and Polt，1988；Centers for Samples Control，1988；Wells et al.，1989；Tedde et al.，1995），亦或血清等动物产品中的外源性物质，特别是那些从世界上地方性传染病高发地区获得的材料，其危险性更大。当证实已被感染时，生物种类将会决定防范的水平；即使感染尚未被证实，样品仍会携带有乙型肝炎

表 6.8 防止生物危害规程和建议的防范水平

操作	防范水平	工作间
培养基制备	GLP	可进行标准微生物学工作的开放式操作台、水平式层流或垂直式层流
除人和灵长类之外的原代培养物和细胞系	1	可进行标准微生物学工作的开放式操作台、水平式层流或垂直式层流
除人和灵长类之外的已被感染或转染的原代培养物和细胞系	1	Ⅱ级 A1 型生物安全柜
人及其他灵长类细胞原代培养和连续传代培养	2	Ⅱ级 A2 型生物安全柜
种间杂交种或其他重组体、遗传操作、转染细胞、人体细胞、动物肿瘤细胞	2	Ⅱ级 A2 型或 B1 型生物安全柜
反转录病毒和小剂量有毒化学物质感染的人体细胞	3	Ⅱ级 B2 型生物安全柜
产生病毒的人类细胞系及由兼嗜性病毒和小剂量有毒化学物质感染的细胞系	3	Ⅱ级 B2 型生物安全柜
携带已知人类病原体的组织样品和培养物	4	配有手套袋、过滤的空气及通风口的病原体捕捉滤器的Ⅲ级病原体通风橱

注：这仅仅是一些建议的操作程序，没有法律基础。在制定合适的指南之前，要参考国家法律要求和地方法规

病毒、人类免疫缺陷病毒（HIV）、结核病菌或其他尚未确诊的病原体等这些可能性仍然存在。如有可能，活检材料应该进行检测，看是否有潜在的外来感染。从保护个人隐私的角度考虑，只有经过患者同意才能进行 HIV 检验，因此许多外来感染的相应信息就难以得到。如果可能的话，权威机构检测需要获得供者的签字同意（表 6.9），但对于需要尽快得到样品进行培养的情况，往往意味着还未进行上述程序就要进行实验。这种样品处理起来必须要非常谨慎。

表 6.9 捐赠者同意表

同意切除组织用于诊断及研究

这张表请求得到您的允许，取您的血样或者取您的一小块或几小块组织用于医学研究。该样品及其衍生出的细胞系或其他产物可能会被许多不同的研究机构所使用，也可能会储存一段时间后再使用。还可能最后被商业公司利用用于未来药物的开发。通过签署这张表，我们还希望您意识到这一点，不论这些组织将做何使用，您不再拥有该组织及产物的所有权。您也应该注意到并同意对这块组织进行所有可能的传染性病原体检测，如艾滋病病毒或肝炎病毒。

我愿意将切除的组织用于医学研究及发展。尽我最大的能力，我已经阅读并了解了相关的背景材料 [如果捐赠者病重无法签字，可由亲属代他（她）签字]。

捐赠者的姓名 ------------　　亲属的姓名 ------------

签名 ------------

日期 ------------

这个材料将被编码，并绝对保密。除了取样品的人之外您的姓名不会告诉任何人。

你是否希望从这份材料中获得与您健康相关的信息？　是/否

签字 ------------　　日期 ------------

您希望让您的医生知道有关的信息吗？　是/否

如果愿意，医生的姓名 ------------

地址 ------------

运输和处理人体活检材料

目前已经出台了一些法规来监管生物材料从一个实验室向另一个实验室的运送，特别是跨国界运输的情况。国际航空运输协会（IATA）已经颁布了相关的航空运输指南（IATA，2013），但最好的办法往往是通过一家熟悉操作程序的中介或快递公司进行运送。进口细胞系需要获得美国农业部（USDA，2012），英国环境、食品和农村事务部（DEFR，2013）及澳大利亚检验检疫局（AQIS，2013）的批准。欧盟指令 ADR 和 RID（HSE，2005a）及美国 NIH（NIH ORS，2014a）会给出生物材料运输的相关建议。规定如下。

（1）运输时，把样品放进一个双层包装容器内（如普通容器或螺旋盖瓶放到另一个拧盖的容器中，如聚丙烯样品罐），然后装在不透明的塑料袋或防水纸信封中，袋子内塞满吸水薄纸以防渗漏，然后以指定的运输工具运送到实验室。

（2）一旦接收，要将所有样品记录在日志上，然后将样品放入标有生物危害标志的安全的冰箱内。

（3）要在一个指定的Ⅱ级生物安全柜中进行解剖和后面的培养工作。生物安全柜最好放在一个与常规细胞培养室分开的房间内。这样能降低感染物如支原体扩散到其他培养物中的风险，也能减少与样品接触，最终发现被感染的人数。

（4）在处理样品时，避免使用锐器（如注射器、解剖刀、巴斯德玻璃移液管）。显然，当需要解剖样品时，这条规则需要妥协，但操作要格外小心。

（5）将所有培养物放入塑料盒内，黏上胶布或贴上标签，注明培养物的生物危险性、负责人的姓名和日期（图 5.11）。

（6）将所有玻璃器皿、移液管、器械等放入消毒剂中消毒或放入生物危害袋中高压灭菌。

如果相关的临床诊断试验表明试验材料没有被感染，而且无支原体，才可以将该活检材料用其他培养。然而，如果需要生成的细胞量在 10^9 以上或要制备纯化的 DNA，那就应该征求当地安全委员会的建议。

如果发现样品被感染，应将感染的样品连同使用过的全部试剂一起丢进双层生物危害袋内，进行高压灭菌或焚烧。把器械或其他金属制品放在盛有消毒液的容器内，至少浸泡 2h，然后高压灭菌。如果必须用这些材料，应该根据病原体的分类（CDC，2009；ACDP，2003）提高防范水平。

6.8.4 细胞系

有关外来污染，原代细胞存在的一个风险与组织样品的来源（来自人、灵长类还是其他动物组织）及获取组织的地点有关，因此应该进行相应的评估（HSE，2005b）。人体细胞培养物及源自它们的有限细胞系都要作为潜在受感染材料来处理，相关试验操作应在Ⅱ级生物安全柜内 BSL 2 防范水平上进行。使用多年而没有发生任何意外的很多连续细胞系或许存在较低水平的风险，方便指出的是，如果一些细胞系必须在Ⅱ级生物安全柜内操作，所有细胞系，当然包括所有人类细胞系都应该在该安全柜内操作。实际上，目前用于细胞培养的生物安全柜大多是Ⅱ级 A2 型安全柜，可以用来进行人类细胞系的培养。给通风橱搭建通向外部空间的管道时会使成本增加，因此

最好是加强室内通风和室内温度的控制。

由于许多人类连续细胞系都来源于肿瘤组织，或者培养时已经被改造，因此会有一个意外接种形成移植瘤的潜在风险（Gugel and Sanders，1986）。虽然风险很低，但还是要避免人类和灵长类细胞系合用同一套针头和其他锐器物。生病、治疗或怀孕等导致的在一定程度上免疫受抑制的个人会面临较高的风险。此外，细胞系不应该产生于在同一个实验室工作的人员，因为偶然性自我接种会产生免疫无应答，这样会构成风险，尤其是单细胞系发生转化时。

6.8.5 遗传操作

任何试图通过核酸转移改变细胞或细胞系遗传组成的操作都需要得到当地生物安全委员会的授权，该机构将会确定生物安全等级和所需的生物安全柜级别（表6.8）。目前使用的法规可从美国健康委员会或国家卫生研究院（CDC，2009a）和英国健康和安全执行委员会（HSE，2014）获得。

6.8.6 生物危险性废物的处理

废弃物处理通常在地方机构指导下进行。根据国家或联邦咨询指南，如美国国家研究委员会（NRC，2009）和英国健康和安全执行委员会（HSE，1999），任何公司或研究机构需要与州或地方政府协商并制定出一套实施规则。潜在生物危害性材料在处理之前必须进行消毒，可以把它们放到未密封的高压灭菌袋内高压灭菌，或浸入杀菌剂如次氯酸盐中消毒（NIH ORS，2014b）。目前，有各种专有制剂可利用，如Chlorox、Virkon（Fisher）、Presept（Medisave）或Haz-Tab片剂等（参见附录III：补充材料中消毒剂相关内容）。地方法规不同，建议的使用浓度也不一样，但可以从产品说明书上获得粗略的使用指导。次氯酸盐一般用量是含300ppm*有效氯，但一些部门要求的有效氯是2500ppm。次氯酸盐简单有效，能彻底清洗那些需要重复使用的器皿，但其腐蚀性较高，特别是在碱性溶液中，它能漂白衣物，甚至腐蚀不锈钢制品（特别是在焊缝处），因此，当用次氯酸盐进行消毒处理时，要戴护目用具、手套，穿实验服或围裙。浸泡槽和浸泡缸需用聚丙烯材料制成。在某些情况下，处理前必须先使次氯酸盐灭活，这可用硫代硫酸钠进行中和（Hegde et al.，2012）。

6.8.7 净化和熏蒸

在工作完成后，生物安全柜应该用乙醇认真擦拭一遍。通常，更为有效的方法是使用喷雾（如Decon-Ahol，VWR），它所覆盖面积更大，而且很容易使乙醇进入缝隙中。但是，一些操作规程要求使用后，如处理高危险性病原体或者对安全柜进行维修，必须对生物安全柜灭菌消毒。常用的方法是甲醛熏蒸，关闭和密封安全柜后用电加热器进行熏蒸，打开层流罩连续通风1h，然后开放

---

* 1ppm=1×10^{-6}。

前屏大约 10min，最后使层流罩运行过夜以排出蒸汽。也可以用过氧化氢（Bioquell）进行通风橱熏蒸，因为熏蒸结束后它很快会挥发掉。

6.9 生物伦理

除潜在的生物危险性外，使用人或其他动物组织会牵涉到许多伦理问题，包括材料的获取、处理及最后的使用（Hansson，2009）。

6.9.1 动物组织

大部分进行医学研究的国家都制定了相应的法规来管理实验动物及其他供体动物组织的使用。这些规定适用于那些脑容量和个体体积较大、对疼痛和应力敏感的高等动物，一般情况下不用于低等的脊椎动物（如鱼）和无脊椎动物。一般认为高等动物在胚胎发育中后期就有了感觉能力，因此必须有法规限定适合高等动物处死或对活体动物进行手术操作的方法，即尽量减少动物的疼痛和不适感。这些限令同样也适用于圈养动物、家畜、畜牧业中动物房内的动物和兽医院中临床实验动物的处置。不论哪种情况，处置动物时，一般是在本地伦理委员会和国家政府部门委任的专业团体组织监管下本地执行。每个国家的法律都不相同，但是与英国地方动物伦理委员会（RSPCA，2014）及美国公共动物管理和使用委员会（IACUC，2014）预约是联系相关许可机构的第一步；许可机构包括美国实验动物福利署（OLAW，2002，2013）和英国民政部（Home Office，2014），或基金组织，如生物技术活动办公室（NIH OBA，2009）或医学研究委员会（MRC，2015）。也可从欧盟动物实验替代参考实验室（ECVAM，2014）获得相关信息。

6.9.2 人体组织

人体组织材料一般是在临床条件下由一个经验丰富的医生收集，但问题更多的是在组织材料的采集有无正当理由及如何使用这两个方面。由英国人体组织监管局（HT Act，2007）出台的《人体组织法》（HTA，2013）涉及了人体组织，包括尸体组织的采集问题。HT Act 还涉及被切除的组织；一旦一个细胞系产生，就认为它由原始细胞的后代构成，而原始细胞在组织中不复存在，细胞系的使用不再受 HT Act 的约束。

地方管制通过英国研究伦理委员会（REC）和美国伦理审查委员会（IRB）来实施，这些机构根据可能产生的结果确定人体组组采集工作是否合理和正当。利用人体组织材料开展实验之前，最好是在实验规划阶段，必须要与 IRB 或 REC 协商，因为大部分资助机构都会要求有伦理委员会的批准证明才能提供研究资金。在英国，REC 通过制定的“国家研究伦理道德服务”（NRES，2013）进行工作，伦理审查申请通过综合研究应用系统建立（IRAS，2014）。在美国，IRB 注册在人类研究防护署（OHRP）（USDHHS，2014；NIH，2011）。相关法规可以从美国食品药品监督管理局（FDA）（FDA，2014）获得。美国总统已设立了生物伦理问题研究总统委

员会（PCSBI，2014），也可以从《赫尔辛基宣言》（WMA，2008）和所谓的共同规则（NSF，2014）中获得相关指导。在 Rebecca Skloot 一本有趣的书中（Skloot，2010）也对此展开了较为详细的讨论。

但凡有关胚胎组织的问题，一定要咨询美国人类研究防护署（OHRP，2003）和英国人工授精与胚胎学管理局（HFEA，2012）。欧洲各国虽立法各异，但信息可通过互联网上的时事通讯获得（EuroStemCell，2013）。

另外一个是组织材料的所有权问题，如DNA、特定的基因组序列、依赖来源于该组织的所有细胞系，以及以营利为目的出售的产品和实验技术等。因此需要解决以下问题（另见Geraghty et al.，2014）。

（1）除了临床需要外，在以研究为目的获取组织材料之前，必须有患者及亲属的知情同意书。

（2）应制定一个合适的、格式上容易被理解的捐赠者同意表（表 6.9），征求患者或供者的同意，并提请注意取组织潜在或可能的用途。

（3）若供者没有足够的理性判断能力，可以从亲属那里征得同意。

（4）准备一个关于项目计划的简短概要，用非专业性术语解释你要做什么、为什么做、结果会怎样，尤其是对医学研究的贡献。

（5）必须保证组织来源的保密性。

（6）必须确立细胞系及其衍生物的所有权。

（7）对细胞系随后进行遗传改造的权利。

（8）确立商业合作中的专利权。

（9）供者需要决定组织的遗传信息是否直接或通过主治医师反馈给患者。

（10）要求供者同意对组织进行筛查看是否有外来病原体，并表明他（她）是否希望被告知检测结果。

目前，最简单的手段是组织切除之前建议供者及亲属签署一份放弃声明，否则，所衍生出的细胞系所有权，以及细胞系未来的生物制药开发、它们的基因及产物等涉及的法律方面问题将变得异常复杂。对于一个在医院的患者来说，反馈等同于一个诊断测试，最有可能直接反映给医生；但对于未住院的供者，必须询问他（她）是否希望知道你的发现及其可能产生的影响，这最好通过捐助者的全科医生转达。这些问题最好的处理方法是让供者签一份知情同意书。这样的一份同意书可以事先由研究伦理委员会（REC）提供；否则的话，有必要与 REC 和临床合作者、患者支持团体、资金资助机构等其他参与方相互协商制定一份同意书（表 6.9）。更多信息可通过美国国家卫生研究院（NIH，2011）、英国纳菲尔德生命伦理学委员会（Nuffield Council on Bioethics，2014）和医学研究委员会（MRC，2014）获取。

同意书中最有争议的部分或许是要让供者知道组织将如何使用。这需要用专业术语作一个简要描述，这既不会给供者造成负担，也不会使供者困惑。组织移植有明确的对象，因此不需要作过多科学性解释；而一些操作程序，如转化细胞中基因组和转录异常的检测，则需要作一些概念上的推广。通常，用简单的口头术语写的一个简要概述则需要用专业术语作更详细的描述，要强调其潜在的优势，还要指出涉及的伦理问题，如细胞的遗传修饰，或者通过组织工程技术将细胞

移植到另一个体中。

6.10 质量保证

工业和商业性实验室受相关法规的严格管理，包括操作程序及质量控制方面。而大多数学术性实验室和研究实验室往往采取不那么正式的方法，但也从遵守良好实验室操作规程（Good Laboratory Practice Regulations，1999；FDA，2007，2013；USEPA，2012）中获益，包括质量保证的某些要素。良好实验室操作涉及许多方面，包括上面提到的安全问题，也强调设备设施的维护、记录保存和追踪等。记录不仅要用相关的量化数据记载在某个特定时间做了什么，还要记下培养基、血清和其他试剂的批号以便于追溯到供应商，进而再追溯到提供各种成分的供应商。这通常是由条形码来完成，所以条形码读取器是组织培养实验室的一个有益帮手。

6.10.1 操作程序

将标准操作程序（SOP）引入研究实验室有一定难度，因为随着研究的进展，实验室中不同研究小组可能要求操作程序有变化并能够对其改造。但建议像组织培养实验室这样的共用场地，应该对实验室中一些特定的共同操作有一个明确的SOP。应该提供一个相关指南，或印刷，或放到局域网上，内容包括原代培养、继代培养、克隆、冷冻保存及其他常用技术的标准操作程序，据此，使用者个人也可从中总结出适合自己的一套操作方案。需要有一个人或一个委员会负责指南的编写和更新，同时要与使用者相互沟通以确保能不断更新，满足使用者的需求。除非有看似合理、科学的理由保证不会影响他人对该设备的使用，否则不鼓励对标准操作程序进行修改。然而，唯一现实的是，由于工作的实验性质，必须改变标准操作程序，但在这种情况下，最重要的是操作程序的任何改动都要如实记录下来。这并不意味着 SOP 的永久性或整体性改变，然而若证明对实验是有益的，也可以做此选择。但这必须要达成共识，并在书面上形成一个新 SOP。一定要避免对操作方案口头上的随意传达及造成的偶然偏差。

6.10.2 质量控制（QC）

除对操作程序加以控制外，很有必要对试剂和培养基的配制、仪器设备的操作、设备的维护进行常规检测。一般原则是，试剂配制人员和质控人员、设备使用者和检查者不能是同一个人。坚持做好质控记录，以便出现问题时（如细胞生长方面或污染方面的问题）有资料可查。灭菌的物品应该在载荷内（在相似的包装内或瓶子内）放一个指示器，例如，用于高温高压灭菌的 Thermalog 无菌指示条（参见 10.2.2 节，图 10.3）及记录的结果。像高压灭菌锅、干热灭菌器、恒温箱和冰箱（普通冰箱、超低温冰箱和深冷冰箱）等设备都应该安装自动数据记录仪，且应该定期接受有记录的维护。有关质量控制的具体细节将在后面章节中加以讨论（参见 10.6.1 节、12.2.1 节、13.1 节、13.3 节、14.3 节）。

6.10.3 确认

无论是科学研究还是商业研发，细胞系是否被合理使用必须要得到确认。在工业生产中，最终产品需要得到美国食品药品监督管理局（FDA）或英国国家卓越临床研究中心（NICE）的认可，这是一个法律责任。然而，在学术研究实验室，此要求不是很严格和明确，主要靠的是个人的道德良知。使用那些未得到确认的细胞系，会降低科学研究的可靠性和研究结果的可重复性（Begley and Ellia，2012）（另见12.2节、13.1节）。

确认细胞系内容主要包括3项。

（1）身份验证。这是所声称的细胞系吗？

（2）起源。细胞系如何衍生出来并如何保持的？自其原始隔离出来后，该细胞系发生了什么？

（3）污染。细胞系没有受到任何已知的微生物污染吗？

6.10.4 身份验证

认错细胞是使用细胞系时面临的最严重的问题之一，在后面部分有更为详细的探讨（参见13.1节）。这是确认中最重要的一个方面，然而无论规模有多小，没有一个实验室能承担得起无视这种情况的代价。用几项技术可用于细胞系的识别（参见13.1.4节和短篇综述13.1）。DNA STR分型技术目前被广泛采用，但要求DNA需由供体提供，或者至少从保存期间被认为是合格细胞系产生的早代细胞中获得。SRT分型最常用于人类细胞系。至于其他动物，可以用同工酶分析、线粒体基因条形码或者染色体分析等其他技术来确立物种类别，但是在确认起源个体方面比较困难，尤其是当使用近交系动物时（参见13.6.1节）。在这种情况下，物种识别再结合一个或几个特定属性［如微偏大鼠肝癌细胞系中酪氨酸转氨酸的诱导（Granner et al.，1968）］就足够了。

DNA图谱堪比一个参照基因数据库（表15.5），它们或许还没有确立自己的身份，但能够确认细胞系是否与其他已知细胞系发生了交叉污染（另见13.1节）。如果失败了，细胞系的一系列特征也会毫无疑义地说明细胞的起源（物种、组织等）（见15.4节）。一定要记住，针对规范那些使用某一细胞系的实验室所用的一条或几条标准，是为达到实验目的设立的，所以没必要将其传给其他实验室。重要的一点是在花费大量时间、人力、财力的实验之前，一定要采取方法对细胞系进行身份验证（参见第13章）。不仅所有使用鉴定有误细胞系的工作受到影响甚至变得毫无价值，而且引用使用该细胞系的论文也会使造成的影响成倍增加，因为原引文会被进一步的引用。

6.10.5 起源

确认过程中的一项内容是要求记录细胞系怎样分离出来，以及分离出来后细胞系发生了什么

变化，具体包括：细胞系维持方案、污染检测、净化程序（如果使用）、特性的表达、遗传修饰及自发变异和意外事件等。细胞系来源的相关信息来自有关文献资料和同行的口头描述，这或许是某种细胞系成为首选的原因，但必须要进行独立验证，并作为实验工作进展的一部分添加上去。也就是说，要时刻对日常维护、重大实验发现和冷冻保持等作翔实的记录（参见 11.3.11 节、12.5.8 节、15.3.8 节），因为电子数据表和数据库的使用可以对重复性操作重新记录，而且除了日期、新出现的或者发生改变的特征外，不必重新填写所有的信息，所以记录工作不需要太费力。也可能只需要参考某一具体的 SOP 即可。就像一件古董家具或一幅画那样，细胞系起源越详细、越完整，其价值就越大。

6.10.6 污染

如果发现细胞系被一种或几种微生物污染，即便记录再详细、实验操作再精细，得到的实验结果也没有任何价值，至少其价值要大打折扣。在有明显污染的地方，这已不是问题，因为将培养物丢弃即可，但污染通常是隐秘的，因为：①细胞一直用抗生素维持（参见 12.5.7 节）；②没有进行支原体等常规检测（参见 14.3.2 节）；③对某些病毒或朊病毒没有常规检测方法可使用（参见 14.3.7 节）。以下方法可以避免细胞系污染：①按照正确的无菌技术进行操作（参见 5.1 节）；②从验证正确的细胞库获取细胞系（参见表 15.5）；③在无抗生素条件下培养细胞，即使只持续一段时间（参见 12.5.7 节，图 12.9）；④对支原体作定期筛查（用 Hoechst 33258 染色法检测任何体积大到在荧光显微镜下就可以观察的、含有 DNA 的生物体）（参见方案 14.1）；⑤用 PCR 或让商业公司筛查最常见的病毒。

验证正确的细胞系要在液氮中保存，可根据需要被个人使用（参见 15.4.1 节）。最终使用者可以保存这些细胞系直到研究项目结束，但使用者库存没有作充分鉴定，因此不能再传递给另外一个使用者。新的使用者必须从已被验证的细胞库存中重新获取。

参考文献

ACDP (2013). *The approved list of biological agents* (http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf).

AQIS (2013). *Applications to import quarantine materials* (www.daff.gov.au/biosecurity/import/application).

Begley CG, Ellis LM (2012). Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* **483**(7391):531–533.

BSI (2005). *Microbiological safety cabinets* (www.thenbs.com/PublicationIndex/DocumentSummary.aspx?PubID=76&DocID=274468).

CDC (2009a). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories* (BMBL), 5th ed. (US Dept. Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health). Washington, DC: US Government Printing Office (http://www.cdc.gov/biosafety/publications/index.htm).

CDC (2009b) *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*, Appendix A–Primary containment for biohazards: Selection, installation and use of biological safety cabinets (www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_appendixA.pdf).

CDC (1988). Update: Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other blood-borne pathogens in healthcare settings. *MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report)* **37**:377–382, 387, 388.

CDC-NIOSH (1998). Selecting, evaluating, and using Sharps disposal containers (www.cdc.gov/niosh/docs/97-111/).

CDC-NIOSH (2014). The National Institute for Occupational Safety & Health (www.cdc.gov/NIOSH).

Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanne R, Ikonomi P (2007). Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **43**:344–351

DEFRA (2013). (email–defra.helpline@defra.gsi.gov.uk; postal address–DEFRA, Nobel House, 17 Smith Square, London, SW1P 3JR; www.gov.uk/defra).

ECVAM (2014). *Validation of methods which reduce, refine or replace the use of animals for safety testing and efficacy/potency testing of chemicals, biologicals and vaccines* (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam).

EuroStemCell (2013). *Regulation of stem cell research in Europe* (www.eurostemcell.org/stem-cell-regulations).

FDA (2007). *Guidance for industry. Good laboratory practices; questions and answers*. http://www.fda.gov/downloads/ICECI/EnforcementActions/BioresearchMonitoring/UCM133748.pdf.

FDA (2013). CFR–*Code of Federal Regulations* Title 21. Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies (www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58&showFR=1).

FDA (2014). *Protection of human subjects* (www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=50).

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, McDermott U, Marshall C, Masters JRW, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **111**(6):1021–1046.

Good Laboratory Practice Regulations (1999). www.legislation.gov.uk/uksi/1999/3106/contents/made

Granner DK, Hayashi S, Thompson EB, Tomkins GM (1968). Stimulation of tyrosine aminotransferase synthesis by dexamethasone phosphate in cell culture. *J. Mol. Biol.* **35**:*291–301*.

Grizzle WE, Polt SH (1988). Guidelines to avoid personal contamination by infective agents in research laboratories that use human tissue. *J. Tissue Cult. Methods* **11**:*191–200*.

Gugel EA, Sanders ME (1986). Needle-stick transmission of human colonic adenocarcinoma. *New Engl. J. Med.* **315**(*23*): *1487*.

Hansson MG (2009). Ethics and biobanks. *Br. J. Cancer* **100**:*8–12*.

Hegde J, Bashetty K, Kumar K, Gulati U (2012). Quantity of sodium thiosulfate required to neutralize various concentrations of sodium hypochlorite. *Asian J. Pharm. Health Sci.* **2**:*390–393 (http://ajphs.com/wp-content/uploads/2012/10/08_AJPHS_July_2012_164.pdf)*.

HFEA (2012). *Human embryo research* (www.hfea.gov.uk/161.html).

Home Office (2014). *Research and testing using animals* (www.gov.uk/research-and-testing-using-animals).

Horita A, Weber LJ (1964). Skin penetrating property of drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and other vehicles. *Life Sci.* **3**:*1389–1395*.

HSE (1999). *Safe disposal of clinical waste guidance*, 2nd ed. HSE Books.

HSE (2000,2001). Radiation protection publications (www.hse.gov.uk/radiation/ionising/publications.htm).

HSE (2005a). *Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises.* Appendix 1.2. Transport of infectious substances (http://www.hse.gov.uk/biosafety/biologagents.pdf).

HSE (2005b). *Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises.* Appendix 3.1. Cell cultures (www.hse.gov.uk/biosafety/biologagents.pdf).

HSE (2013). *Providing and using work equipment safely. A brief guide* (www.hse.gov.uk/pubns/indg291.pdf).

HSE (2014). *Infections at work and genetically modified organisms (GMOs)–information on microbiological containment and biosafety* (www.hse.gov.uk/biosafety/).

HSE-COSHH. *Control of substances hazardous to health (COSHH)* (www.hse.gov.uk/coshh/index.htm).

HT Act (2007). Human Tissue (Quality and Safety for Human Application) Regulations 2007 (www.legislation.gov.uk/uksi/2007/1523).

HTA (2013). *Licensing and inspections* (www.hta.gov.uk/licensingandinspections.cfm).

IACUC (2014). (https://www.aalas.org/iacuc#.VeMaZvlVhBc).

IATA (International Air Transport Association) (2013). Dangerous Goods Regulations (DGR) (www.iata.org/publications/dgr/Pages/index.aspx).

IRAS (2014). *Streamlining the research application process* (https://www.myresearchproject.org.uk/).

Management of Health and Safety at Work Regulations (1999). SI. 1999 No. 3242 (www.legislation.gov.uk/uksi/1999/3242/contents/made)

MRC (2015). *Updated RCUK guidance for funding applications involving animal research.* (http://www.mrc.ac.uk/news/news/updated-rcuk-guidance-for-funding-applications-involving-animal-research/).

MRC (2014). *Ethics and research governance* (www.mrc.ac.uk/News-publications/Publications/Ethicsandguidance/MRC003291).

National Research Council (1989). *Biosafety in the laboratory: Prudent practices for handling and disposal of infectious materials.* Washington, DC: The National Academies Press, 1989. (www.nap.edu/catalog.php?record_id=1197).

NIH (2011). *Human subjects research and IRBs* (http://bioethics.od.nih.gov/IRB.html).

NIH-OBA (Office of Biotechnology Activities) (2009). *Animal experiments covered under the NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA molecules* (http://oba.od.nih.gov/oba/ibc/FAQs/Animal%20Experiments%20Covered%20under%20the(%20NIH%20Guidelines.pdf).

NIH-ORS (Office of Research Services) (2014a). *Biological materials shipping* (www.ors.od.nih.gov/sr/dohs/BioSafety/shipbio/Pages/shipping_biological_material.aspx).

NIH-ORS (2014b). *Decontamination and sterilization* (www.ors.od.nih.gov/sr/dohs/BioSafety/decon/Pages/decontamination.aspx).

NRC (2009). *Biosafety in the laboratory: Prudent practices for the handling and disposal of infectious materials.* Washington, DC, National Academy Press. HYPERLINK "http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=1197" www.nap.edu/catalog.php?record_id=1197.

NRES (2013) National Research Ethics Service. www.nres.nhs.uk.

NSF (2014) National Science Foundation Office of Budget, Finance and Award Management. Human Subjects. www.nsf.gov/bfa/dias/policy/human.jsp

NSF/ANSI 49 (2008). *Biosafety cabinetry: Design, construction, performance, and field certification* (www.nsf.org/services/by-industry/pharma-biotech/biosafety-cabinetry/nsf-ansi-49-biosafety-cabinetry-certification/).

Nuffield Council on Bioethics (2014). *Exploring issues in biologu and medicine* (www.nuffieldbioethics.org/).

OHRP (Office for Human Research Protections) (2003). *Fetal tissue transplantation* (www.hhs.gov/ohrp/policy/fetal.html).

OLAW (2002). *Institutional animal care and use committee guidebook.* Office of Laboratory Animal Welfare and Applied Research Ethics National Association (http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm).

Osborne R, Durkin T, Shannon H, Dornan E, Hughes C (1999). Performance of open-fronted microbiological safety cabinets: The value of operator protection tests during routine servicing. *J. Appl. Microbiol.* **86**:962–970.

OSHA (2014). *The essential health & safety manual* (www.osha-occupational-health-and-safety.com/).

PCSBI (2014). Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues (www.bioethics.gov/).

RSPCA (2014) (www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/ethicalreview).

Scanlon EF, Hawkins RA, Fox WW, Smith WS (1965). Fatal homotransplanted melanoma (a case report). *Cancer* **18**:782–789.

Skloot R (2010). *The immortal life of Henrietta Lacks.* New York: Crown Publishers.

Southam CM (1958). Homotransplantation of human cell lines. *Bull. NY Acad. Med.* **34**:416–423.

Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, Linch DC, Heptonstall J, Brink NS (1995). Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* **346**:137–140..

UC (University of California) San Diego (2014). *How to label, package, and dispose of biohazardous and medical waste* (http://blink.ucsd.edu/safety/research-lab/hazardous-waste/medical/dispose.html).

USDA (2012). *United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Animal health permits* (www.aphis.usda.gov/permits/index.shtml).

USDHHS (US Department of Health and Human Services) (2014). *Institutional review boards (IRBs)* (www.hhs.gov/ohrp/assurances/irb/).

USEPA (US Environmental Protection Agency) (2012). *Good laboratory practices standards* (www.epa.gov/oecaerth/monitoring/programs/fifra/glp.html).

USNRC (US Nuclear Regulatory Commission) (2013). *Medical, industrial, & academic uses of nuclear materials* (www.nrc.gov/materials/medical.html).

Wells DL, Lipper SL, Hilliard JK, Stewart JA, Holmes GP, Herrmann KL, Kiley MP, Schonberger LB (1989). Herpesvirus simiae contamination of primary rhesus monkey kidney cell cultures: CDC recommendations to minimize risks to laboratory personnel. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:333–335.

Wipe test procedure (2012). University of Western Australia; Safety, Health and Wellbeing. (www.safety.uwa.edu.au/topics/radiation/radioactive-materials/wipe-test).

WMA (World Medical Association) (2008). Declaration of Helsinki–ethical principles for medical research involving human subjects (http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html).

（徐存拴 译）

第 7 章

培养器皿和附着物

7.1 附 着 物

7.1.1 附着和生长

在人工附着物上，大多数体外培养的脊椎动物细胞呈单层生长，因此，附着物必须带有适合细胞附着或至少适合附着因子吸附的电荷，附着因子会进一步促进细胞的附着和铺展。虽然造血细胞系、啮齿动物的腹水瘤细胞和少数其他选择细胞系，如人小细胞肺癌（Carne et al.，1981）可在悬浮条件下自发生长；但许多转化细胞系也可以进行悬浮生长，因此，它们的生长并不依赖附着物表面的电荷。然而，大多数正常细胞增殖前，需要在附着物上铺展（Folkman and Moscona，1978；Irelan et al.，1989；Danen and Yamada，2001；Shen et al.，2013），附着不好或过度密集造成铺展不充分时，可抑制细胞增殖。需要附着才能生长的细胞被称为贴壁依赖性（achorage dependent）细胞。转化的细胞常表现出非贴壁依赖性（achorage independent）（见 22.4.1 节），它们能在振荡培养条件下进行悬浮生长，或在半固体培养基如软琼脂上进行生长（参见 12.4.5 节）。

但也有例外情况，如转化细胞一般会生长成球状（参见 20.3.3 节），而正常细胞有时可形成所谓类器官的三维聚集物。就像在球体内一样，类器官中细胞的增殖会受到限制。干细胞也可以生长成聚集物（参见 26.1 节）。当聚集物附着在一个涂有饲养层的底物上时，它们会生长成三维集落，集落边缘的细胞以增殖为主，而集落中心的细胞往往趋向分化，特别是当集落变大时。一些因子，如白血病抑制因子（LIF）、骨形态发生蛋白（BMP）等在维持干细胞表型方面起重要作用（Ying et al.，2003）。像人胚胎干细胞（hESC）和诱导性多能干细胞（iPSC）等干细胞将会长出悬浮的聚集物或球状体，但当被接种时，它们又趋向分化。

附着遇到的最大困难是如何让细胞附着上去，包被附着物有可能会促进细胞的黏附（参见 7.2.1 节）。

7.1.2 常用的附着材料

一次性塑料 一次性无菌聚丙乙烯培养瓶、培养皿或多孔板为培养物提供了一种简单、重

复性好的附着物。它们的透光性好、生长面平滑、能够提供质地均匀、重复性好的单层培养物。由于是人工合成的，因此聚丙乙烯是疏水性的，表面不适合细胞生长，故用于组织培养的塑料要经 γ 射线照射、化学处理或电离辐射，以产生亲水的带电表面。由于不同制造商的产品质量不同，因此，使用前要对不同来源的样品进行检测。方法是测定正在使用的细胞在含有限制浓度血清或不含血清的培养基中的生长率和接种效率（参见方案 23.1~方案 23.7）。对一种新的附着物进行测试，首先让细胞在其处理或未处理表面上形成规则的单层细胞，然后再克隆细胞（参见方案 23.10）。

玻璃 因其光学特性和表面电荷而成为最原始的附着物，但现在在大多数实验室里，玻璃已被一致性和光学特性更好的聚丙乙烯所取代。尽管玻璃具有价格便宜、易清洗还不会丢失支持细胞生长特性、可进行干热和湿热灭菌、透光性好等优点，但现在已很少使用。只有用强碱（如 NaOH 或腐蚀性去污剂）处理，然后酸洗中和的玻璃才适于培养细胞（参见 10.3.1 节）。高光学质量的玻璃呈碱性，但含铅量高一般会减慢细胞生长。因此，载玻片和盖玻片需用酸洗或涂层以达到最好的效果（参见 7.2.1 节）。

7.1.3 附着物替代品

其他塑料 虽然细胞也能在聚氯乙烯（PVC）（Gabriel et al.，2012）、聚碳酸酯（Karamichos et al.，2014）、聚四氟乙烯（PTFE）（Krishna et al.，2011）、Mylar/Melinex（Bettega et al.，1998）、Thermanox（TPX；Thermo Scientific Nunc）、聚甲基丙烯酸（PMMA；Plexiglas, Perspex, Lucite）（Gottwald et al.，2008；Mattotti et al.，2012）及其他许多塑料上生长，但目前聚丙乙烯是最常用、最便宜的塑料附着物。

纤维 人造丝、尼龙、聚左旋乳酸（PLA）、聚羟基乙酸（PGA）及丝状纤维在组织工程中常被用作二维和三维支架（参见 20.1.3 节，短篇综述 20.1；图 20.2~图 20.4），特别是 PLA、PGA 和丝状纤维等生物可降解性材料。

衍生物 用 RGD 三肽（Gabriel et al.，2012）可衍生出非天然黏附性的附着物，常见的包括五肽 GRGDS，它们能与细胞表面整合素之间相互作用（参见 2.2.1 节）。EDC［1-甲基-3-（3-二甲基氨丙基）碳二亚胺盐酸盐］和 *N*-羟基磺基琥珀酰亚胺（sulpho-NHS）已被用于衍生出能作为骨组织工程支架的经加工处理的丝状纤维（Hofmann et al.，2006），而且这种处理很可能适用于一些其他基质（如 Lao et al.，2008）（另见 7.2.1 节中有关“胶原”部分）。

金属 细胞可以在不锈钢盘（Birnie and Simons，1967）或其他金属表面（Bledsoe et al.，2004）上生长。如果细胞生长的金属表面不是非常薄，那就需要用表面干涉显微镜观察在不透明附着面上生长的细胞。Westermark（1978）建立了一种能使成纤维细胞和神经胶质细胞在金属钯上生长的方法。他用电子显微镜投影设备在琼脂糖凝胶上制出钯岛。这种结构可防止细胞在液体培养基里附着。钯岛的大小和形状通过电子印刷线路法给出轮廓（参见 7.2.1 节）。然后，像电子显微镜一样，在真空中把钯岛投影到显示屏上。因为轮廓层非常薄，所以可保持透明。

7.2 表面处理

7.2.1 附着物包被

条件 预处理附着物能提高细胞的附着和生长能力（参见方案25.9-Su）（Lechner et al.，1981）。一个成熟的组织培养经验告诉我们，用过的玻璃器皿比新玻璃器皿更利于细胞生长（Paul，1975）。如果真是这样，这可能是因为表面蚀刻或组织培养后有微量残迹留，即在培养瓶内细胞的生长会改善附着面从而有利于下一次细胞接种。这些物质可能是胶原、纤连蛋白或细胞释放的其他一些基质产物（Gospodarowicz et al.，1980）。用来自其他培养物的培养基（Stampfer et al.，1980）、血清、纯化的纤连蛋白或胶原（Colombo et al.，2013）（参见下文和方案25.9-Su）处理附着面，可改善培养条件。

聚合物、纳米颗粒和光刻与图形化 McKeehan 和 Ham（1976a）发现，在缺乏血清条件下克隆细胞必须以浓度为1mg/mL的多聚-D-赖氨酸（PDL）包被塑料培养皿（参见16.2.1节）。同样的技术也可用于促进神经突触生长（参见25.4.1节），因此一些条件作用效应可能与表面电荷有关。多聚-D-赖氨酸异构体优于多聚-L-赖氨酸（PLL）是由于前者不容易被细胞外液蛋白酶水解，但是两者目前都在使用。PLL目前已应用在神经细胞的微图形化实验中（Belkaid et al.，2013）。分子量越高，黏滞性越强，同时结合位点也更多；100kDa（MP Biomedicals）和500kDa（MP Biomedicals）市场上均有出售。其他许多技术也被描述可用于图形化聚苯乙烯，如UV辐照光刻（Ploss et al.，2014）、喷墨打印（Roth et al.，2004；Yamaguchi et al.，2012）等。纳米金刚石颗粒也已被用来修饰培养底物以促进神经干细胞增殖和分化（Chen et al.，2009）。培养物图形化可用于2D和3D（参见第20章）交互排列细胞层的重构，进而应用于组织工程、高通量筛选（参见21.5.2节）和基本形态研究等方面。

胶原和明胶 用变性胶原处理后能改善多种细胞的附着能力，如上皮细胞（Sarang et al.，2003；Patel et al.，2014），而天然的未变性胶原可能是细胞分化功能表达所必需的（Sattler et al.，1978；Berdichevsky et al.，1992）（参见2.2.43节、19.7.3节、25.2.1节）。已经发现，包被明胶有利于肌肉细胞（Richler and Yaffe，1970）和内皮细胞的培养（Folkman et al.，1979）（参见25.3.6节；BioCoat、Corning）。用变性胶原包被的方法是：将鼠尾胶原或市售的替代品（如PureCol、Advanced BioMatrix或BioCoat、Corning）制成溶液倾倒在培养器皿表面，吸除多余的溶液，并使残留液干燥即可。因为这种方法有时会导致胶原层在培养过程中脱落，为此Macklis等（1985）设计了一种把碳二亚胺交联到塑料里的方法，能确保胶原牢固地黏附在附着面上。胶原也可以与纤连蛋白联合使用（参见方案25.9-Su）。

胶原也可以作为一种天然的非变性凝胶使用（参见19.7.3节），支持鸡胚脊神经节的神经突触生长（Xie et al.，2013）、乳腺细胞（Nicosia and Ottinetti，1990；Berdichevsky et al.，1992）和肝细胞（Sattler et al.，1978；Fiorino et al.，1998）的形态分化，促进其他许多离体细胞组织特异性功能的表达［如角蛋白细胞（Mass-Szabowski et al.，2002）；见25.2.1节］。按1∶10的比例用培养基稀释胶原，然后将调pH至7.4，液态胶原即变成凝胶，因此稀释和分装必须迅速。最好在生长培养基添加到凝胶中后静置4~24h，以确保加入细胞前凝胶与培养基达到平衡。在这期

间，可向培养基中加入纤连蛋白（25~50μg/mL）或层粘连蛋白（1~5μg/mL），或者二者同时加。

基质成分 来自 Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤的 Matrigel™（Corning）等市售基质（表 7.1，20.2 节）含有层粘连蛋白、纤连蛋白和蛋白聚糖，其中层粘连蛋白含量最多（参见 16.7.3 节）。目前，用这些基质产物预先包被的培养板已有出售（BioCoat，Corning；Millicoat，EMD Millipore）。其他基质产品包括蛋白粘连素 F、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、巢蛋白、硫酸乙酰肝素、ECL 和 Cell-tak 等（表 7.1）。其中许多是天然产物，如果其化学成分不完全明确，需要一定的纯化；其余的则是基质产物的混合物，性质很难确定，可能还含有一些结合性生长因子。然而，细胞外基质中的许多成分都可以作为重组蛋白使用（表 7.1），因此成分明确，可以纯

表 7.1 基质材料

材料	组成	来源	供应商
BioCoat	PDL 及各种基质成分	多种	Corning
Cell-Tak	多酚类蛋白	贻贝	Corning
胶原（各种）	胶原 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ	人、牛科动物、大鼠尾	Biocoat，Corning；PureCol，Advanced BioMatrix
Cultrex	层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原 Ⅳ、蛋白聚糖、生长因子（可使用生长因子）	EHS 肉瘤	Amsbio；Trevigen
ECL	巢蛋白-胶原Ⅳ-来自 EHS 肉瘤的层粘连蛋白	天然	US Biological
ECM	胞外基质蛋白，各种	天然	Sigma-Aldrich；见补充材料附录Ⅱ：基质
EHS Natrix	层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原Ⅳ、蛋白聚糖、生长因子	EHS 肉瘤细胞系	BioCoat，Corning
纤连蛋白	来自胞外基质的附着蛋白	天然	Sigma-Aldrich
纤连蛋白	来自胞外基质的附着蛋白	重组	Takara Clontech
硫酸乙酰肝素	基质蛋白多糖	天然	Corning，Sigma-Aldrich
层粘连蛋白	来自基膜的附着蛋白	天然	BioCoat，Corning
层粘连蛋白	来自基膜的附着蛋白	重组	Amsbio（Kortesmaa et al.，2000；Belin and Rousselle，2006）
Matrigel	层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原Ⅳ、蛋白聚糖、生长因子（可使用生长因子）	EHS 肉瘤	BD Biosciences
MaxGel ECM	人胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、肌腱蛋白、弹力蛋白（eleastin）、蛋白聚糖，GAGs；细胞培养衍生		Sigma-Aldrich
Millicoat	胶原、纤连蛋白、PDL 预包被培养板和微孔板条	各种	EMD Millipore
ProNectin F	富含多个 RGD 抗原决定簇的蛋白多聚体	重组	MP Biomedicals，Sigma-Aldrich
玻连蛋白	来自胞外基质的附着蛋白	天然	Corning；Biosource International（Life Technologies）；Merck-Millipore；Sigma-Aldrich
玻连蛋白	来自胞外基质的附着蛋白	重组	Life Technologies；Merck Millipore；Stem Cell Technologies；Sigma-Aldrich

化。而成分不明确的天然产物是唯一的实现建立培养体系的一条道路。如果需要基质，长期目标应该是用像重组蛋白那样成分明确的物质。

细胞外基质 虽然表面有惰性包被已经足够了，但仍然有必要利用合适的单层细胞培养物为某些特殊细胞类型提供合适基质，Gospodarowicz 等（1980）用 Triton X-100 去除汇合的 3T3 单细胞层后，能使内皮细胞在残留于附着面的胞外基质上生长。这种残留的细胞外基质（ECM）也用于促进卵巢颗粒细胞分化（Gospodarowicz et al.，1980）和研究肿瘤细胞行为（Vlodavsky et al.，1980）及血管形态发生（Park et al.，2014）。制备见方案 7.1。

方案 7.1 细胞外基质（ECM）的制备

概要

用去污剂除去融合后的单层基质形成细胞，培养培养瓶或培养皿，然后将所需要的细胞接种在残留的基质上。

材料

- 小鼠成纤维细胞（如 3T3）、MCR-5 人成纤维细胞、CPAE 牛肺动脉内皮细胞或其他任何适于产生细胞外基质的细胞系
- 无菌超纯水（UPW）（参见 10.4.1 节）
- 1% Triton X-100，用灭菌 UPW 配制

操作步骤

1. 培养基质合成细胞，直至长到汇合状态。
2. 汇合后 3~5 天，除去培养基，加入等体积的 UPW 配制的无菌 1% Triton X-100 于单层细胞上。
3. 37℃孵育 30min。
4. 去除 Triton X-100 溶液，用等体积的无菌 UPW 冲洗残留物 3 次。
5. 培养瓶或培养皿可直接被使用，也可在 4℃条件下存放 3 周。

7.2.2 饲养层

基质覆盖有助于细胞的附着、生长和分化。一些难培养的细胞，尤其是低细胞密度下更难培养的细胞（Puck and Marcus，1955），需要活细胞来维持（如小鼠胚胎成纤维细胞）（见方案 16.3、方案 25.28）。原因可能是成纤维细胞（其实是原始间充质细胞，而非成纤维细胞）的代谢物渗漏或成纤维细胞分泌生长因子对培养基的补充，也可能由于细胞产物优化了细胞的附着面。生长成汇合单层细胞的饲养层可为其他细胞的附着提供一个合适甚至是选择性的表面（参见 16.23 节、25.13.2 节，方案 25.1-Su、方案 25.4-Su）。单层神经胶质细胞可以促进中枢和外周神经元的存活及伸长，虽然这种情况是由扩散因子而不是直接的细胞接触引起的（Corbett et al.，2013；Xu et al.，

2013；Ganz et al.，2014）。

单层培养物达到汇合状态后，接下来的增殖会导致细胞与人工附着面脱离，并迁移到单层细胞表面。细胞形态也会发生变化（图 7.1；另见彩版 6c、6d），如细胞铺展不良、着色较深和高度分化。显然这并不令人惊讶，因为细胞与其下层基质的相互作用不同于细胞与合成基质附着面的相互作用，前者引起细胞形态改变，降低了细胞的增殖潜能。


彩版6

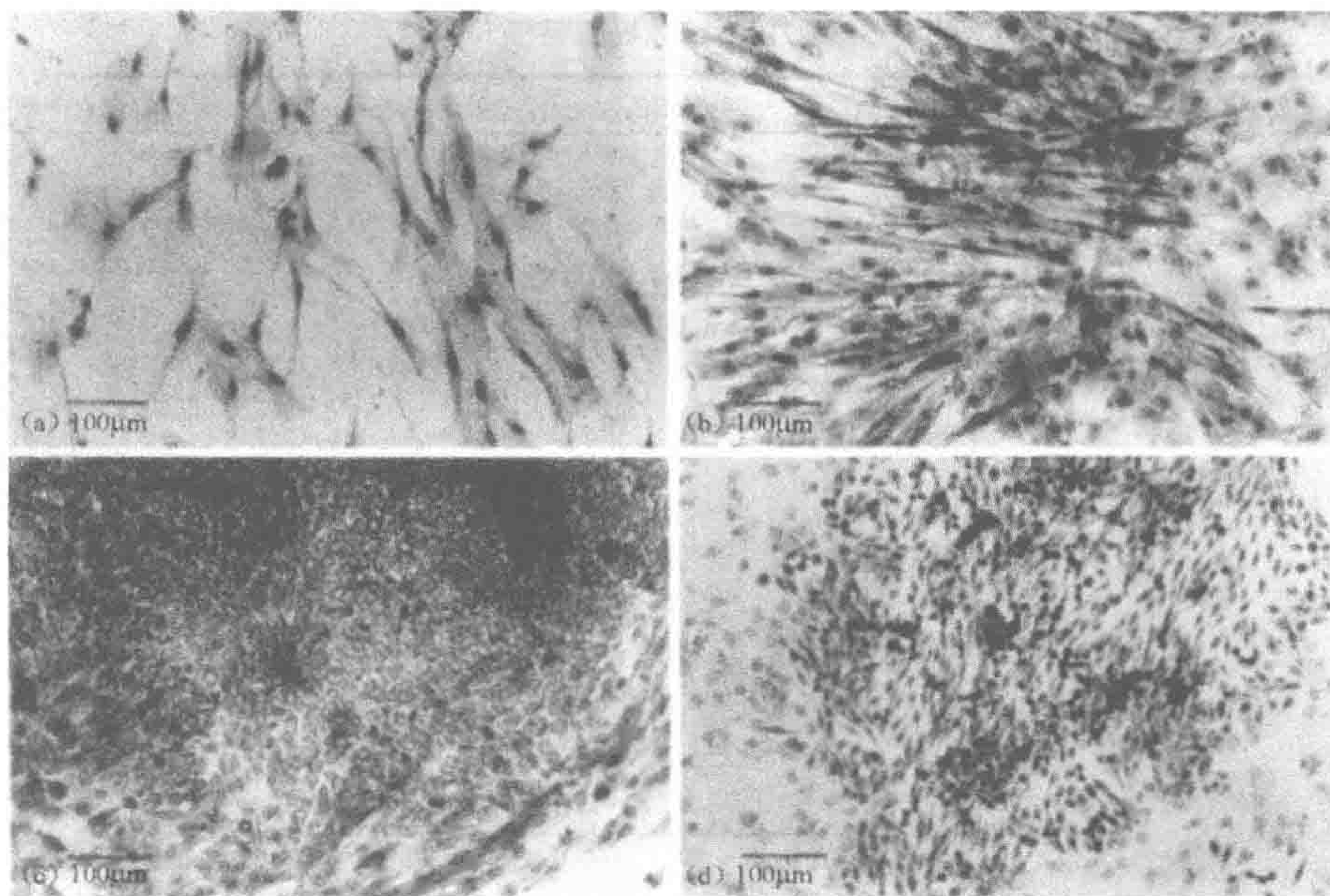


图 7.1 饲养层细胞的形态。生长在饲养层上的细胞形态变化：人乳腺癌成纤维细胞生长在（a）塑料支持物上和（b）人胎小肠细胞（FHI）汇合饲养层上。人乳腺癌上皮细胞生长在（c）塑料支持物上和（d）像图（b）中一样的 FHI 细胞汇合饲养层上

7.2.3 非黏性附着物

有时并不希望细胞附着。例如，选择非贴壁依赖性的病毒转化细胞时，可通过将细胞接种到琼脂中的方法来实现（Macpherson and Montagnier，1964），因为在这些基质中未转化的细胞不易形成集落。此过程涉及 3 个原则：①预防附着到培养器皿底部，因为细胞一旦附着到底部，就会发生铺展和贴壁依赖性生长；②固定细胞以使产生的子细胞能聚集（即使不黏附）在一起形成集落；③悬浮细胞基因表达可能会发生改变（Feng et al.，2003）。目前最常用的是琼脂、琼脂糖或 Methocel（甲基纤维素的黏度为 4000cP）（参见 13.3 节）。前两种为凝胶，第三种为高黏度溶胶。因为甲基纤维素是溶胶，细胞可以在其中缓慢下沉，因此常在其下面放一层琼脂（参见方案 16.5）。非组织培养基的器皿上不涂琼脂层也能达到细胞培养的目的，但有时会出现细胞附着和铺展。

7.3 培养器皿的选择

塑料培养瓶、培养板和培养皿在许多供货商处都可以买到（如 Corning；Nunc，Thermo Fisher；

另见补充材料附录III）。一些代表性的培养器皿被在列表 7.2 中。培养器皿的选择依赖于培养的目的。如果培养的目的是产生细胞或产物，那么主要的决定因素是①需要的细胞量；②细胞是悬浮生长还是单层生长；③要求通气培养还是密闭培养；④若目的是分析，选择是否会受每个检测样品中需要细胞数量（取决于检测的灵敏性）的影响，反过来会限制每次培养的规模；⑤取样频率；⑥所用的分析方法（生化、分子、细胞或免疫学方法）；⑦成本。

表 7.2 培养器皿特征

培养器皿	重复	培养体积	表面积（cm^2）[a]	大概的细胞产量（HeLa）
微孔板				
微量滴定板	96	0.1~0.2mL	0.3	1×10^5
微量滴定板	144	25~50μL	0.06	1×10^4
微量滴定板	1536	8μL	0.03	1×10^4
多孔板				
4 孔板	4	2	2	5×10^5
6 孔板	6	2	10	2×10^6
12 孔板	12	1	3	7.5×10^5
24 孔板	24	1	2	5×10^5
培养皿				
3.5cm 直径	1	2	8	2×10^6
5.0cm 直径	1	4	17.5	4×10^6
6.0cm 直径	1	5	21	5×10^6
9.0cm 直径	1	10	49	1×10^7
培养瓶				
$10cm^2$（T10）	1	2	10	2×10^6
$25cm^2$（T25）	1	5	25	5×10^6
$75cm^2$（T75）	1	20	75	2×10^7
$175cm^2$（T175）	1	50	175	5×10^7
$225cm^2$（T225）	1	75	225	6×10^7
旋转培养瓶	1	200	850	2.5×10^8
多表面扩增器				
Nunc Triple-Flask	1（3 层）	200	500	1×10^8
Falcon Multi-Flask（Corning）	1（3~5 层）	120~200	525~875	
Corning Hyper-Flask	1（10 层）	560	1720	5×10^8
Nunclon Cell Factory	1（1~40 层）	200~8 000	632~25 284	$2\times10^8\sim75\times10^8$
Corning Cellstack	1（1~40 层）	150~8 000	636~25 440	$2\times10^8\sim75\times10^8$
搅拌瓶				
500mL（非喷洒）	1	50		5×10^7
5000mL（喷洒）	1	4 000		4×10^9

a 这些数字都是近似值，实际面积因来源而异

7.3.1 细胞产量

对于单层培养物来说，细胞产量与培养瓶的有效表面积成比例（图 7.2）。HeLa 细胞在每种

培养器皿中都有相应的预期产量（表 7.2）；有限细胞系的产率（如二倍体成纤维细胞）的产量大约是 HeLa 细胞产量的 1/5。细胞的最高产量也受到营养物浓度，尤其是氨基酸浓度的大小（Amable and Butler，2008）、必要生长因子的使用及乳酸和氨等代谢物增多（参见 12.4.3 节、12.5.1 节）的影响。生长速率也受氧摄取量的影响，但一般取决于培养基深度（依赖于培养基体积与培养物表面积比值，一般为 0.2mL/cm^2）和抑制 pH 的 CO_2 生成量。

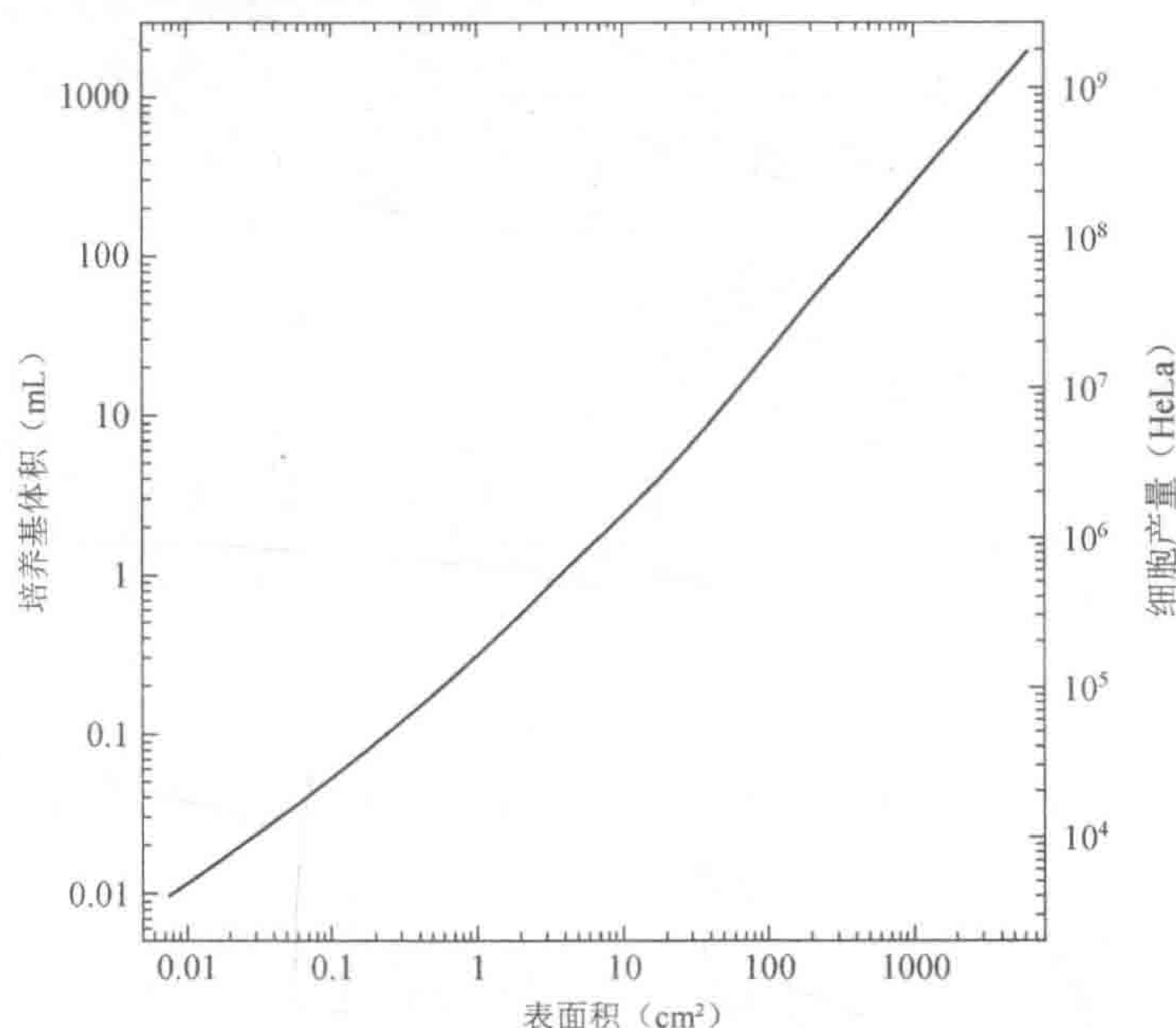


图 7.2 细胞产量与表面积。培养基体积和细胞产量与培养器皿表面积之间的关系。用培养基的体积对培养器皿的表面积作图，结果是非线性的，因为与较大器皿相比，使用较小器皿用的培养基会相应增多。细胞产量基本上取决于培养基的体积

有从微孔板（图 7.3，见 7.3.3 节）到转瓶（表 7.2）等各种规格的培养器皿可以使用。中等大小的培养器皿包括面积为 10~225cm^2 大小不等的培养皿（图 7.4）和培养瓶（图 7.5）。大规模培养会增加其复杂性，因为对于黏附细胞来说需要更大的表面积，并且需要维持充足的氧和二氧化碳的交换（参见 21.1 节、21.2 节，表 7.2）。

7.3.2 多孔板

进行微量的多次重复实验时最好使用多孔板（图 7.3），它带有许多小孔，如带有 96~1536 个孔的微量板，或者带有 4~24 个孔的多孔板（表 7.2）。多孔板一般由透明的聚苯乙烯制成，微孔板尽管有一个透明的生长区，可以是透明的，但也可以是白色或者黑色。组织培养处理型多孔板为平底，而非组织培养处理型细胞板为锥形底或圆底。有许多设备可以用来自动灌注、清洗，并根据吸光度、荧光、发光或放射性读取数值（参见 21.5.2 节、24.3.5 节）。

多孔板和微孔板都要有相匹配的盖子可用，但需要用胶黏膜密封（如 Alpha Laboratories）。这样密封的好处是降低蒸发，所有孔是相当的。若用普通的宽松盖子，细胞板边缘的蒸发和气体

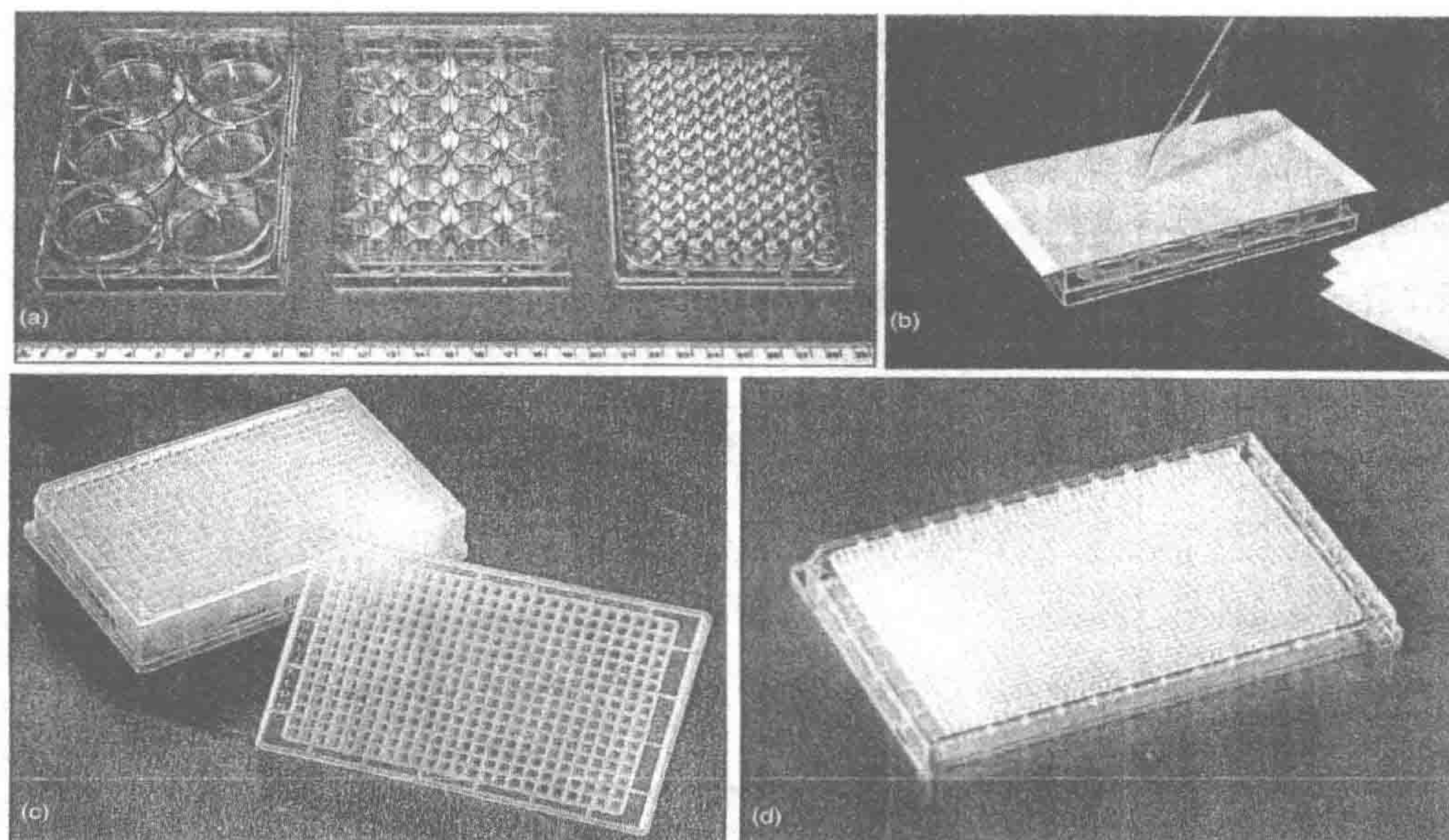


图7.3 多孔板和微孔板。 有从4孔到1536孔等各种孔数的培养板可以使用。(a) Nunc 6孔板、24孔板和96孔板；(b) AeraSeal透气性封闭板（有ALpha Laboratories提供）；(c) 带方孔的Corning 384微孔板，后面的为深孔板；(d) 带圆孔的Corning 1536微孔板（有关孔的大小和容量，请查看表7.2）。标尺仅用于(a)，虽然培养板的尺寸一样大

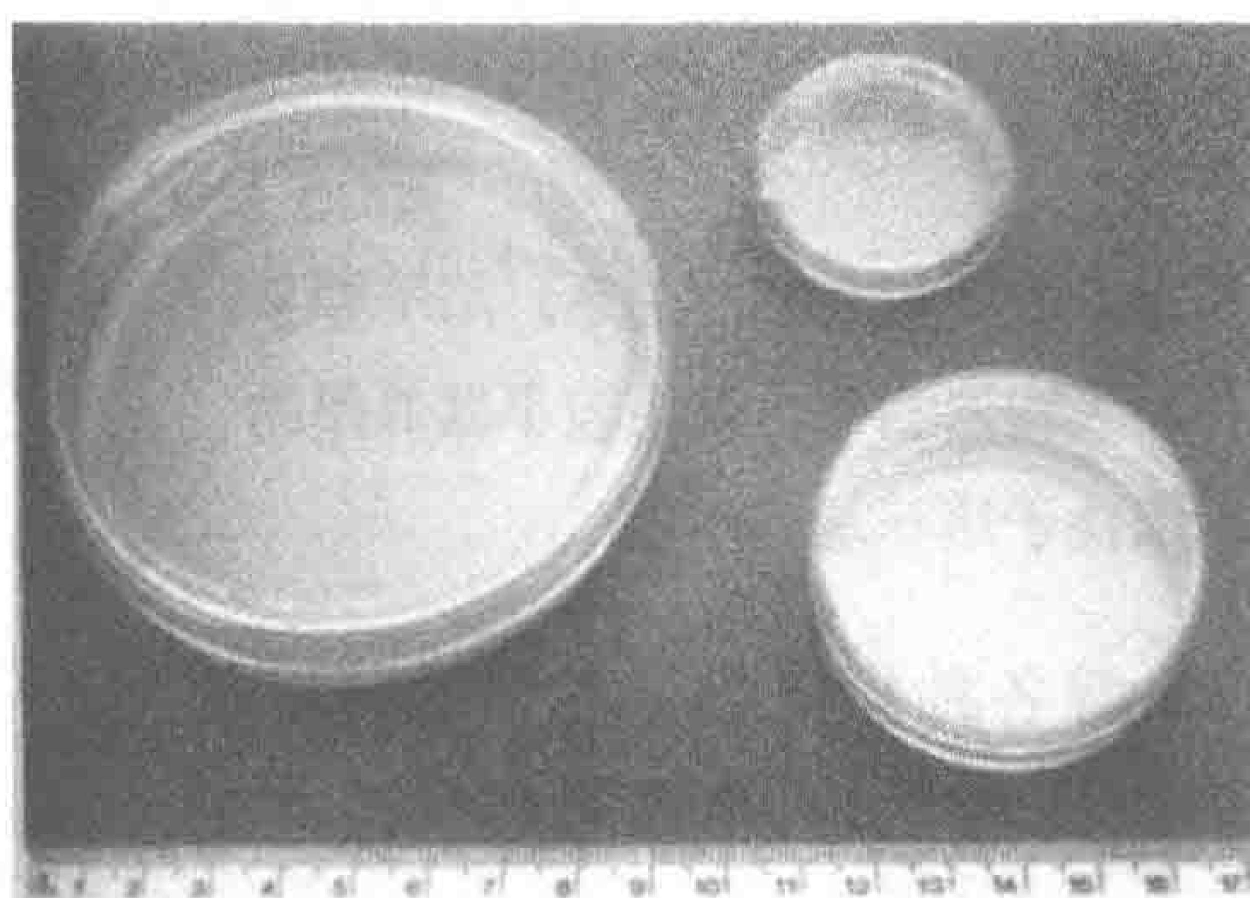


图7.4 培养皿。 图中显示的是35mm、50mm和90mm直径培养皿。市场上也有尺寸为90mm×90mm的方形培养皿。网格图形在菌落计数中有助于培养皿的扫描，但会干扰自动菌落计数结果

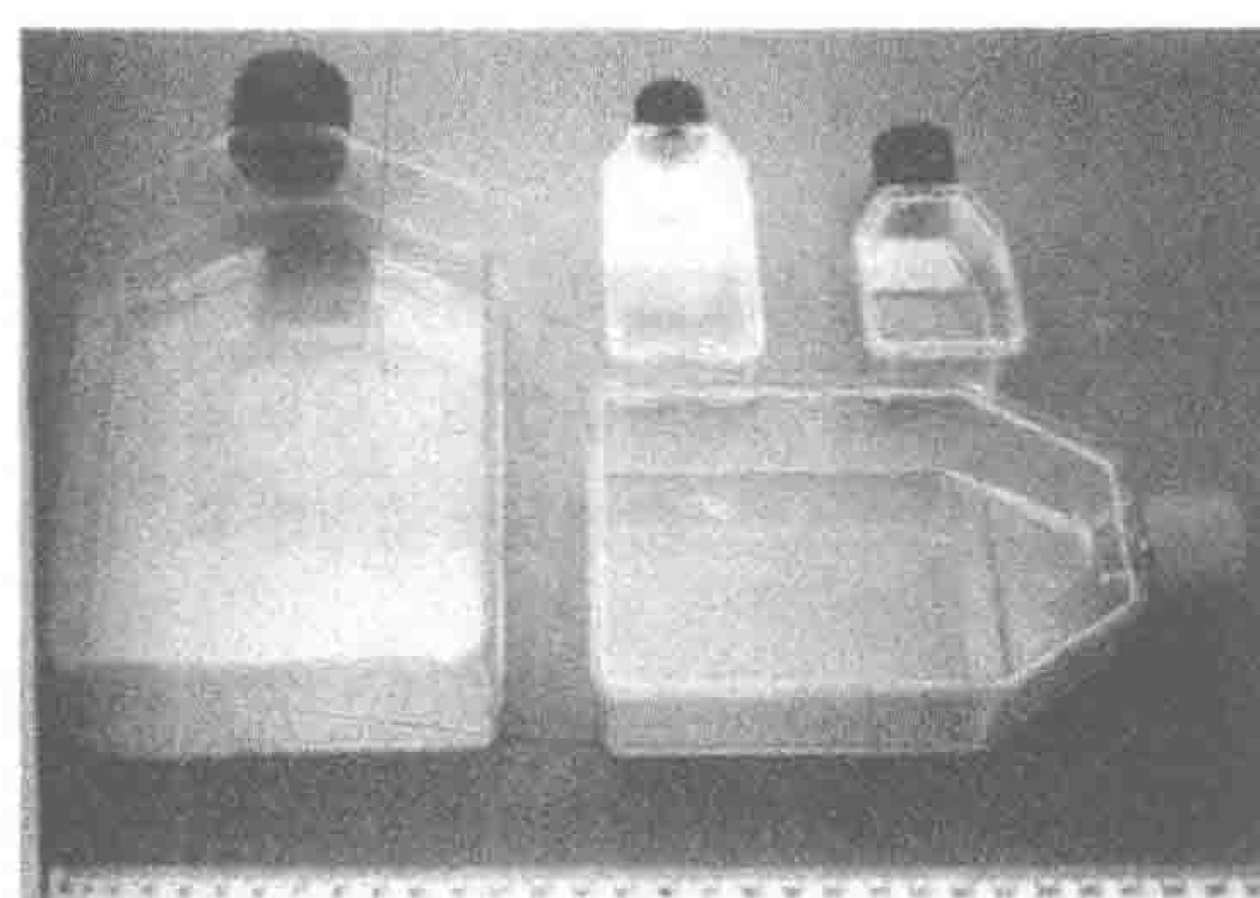


图7.5 塑料培养瓶。 图中所示的尺寸为10cm^{2}和25cm^2（Falcon）、75cm^2（Corning）和185cm^2（Nalge Nunc）塑料培养瓶（表7.2列出了塑料培养瓶常见的尺寸和容量）。标尺上面的标记是10cm间隔

交换的速率就会改变，从而形成所谓的边缘效应，引起细胞板边缘孔内的细胞生长速度变慢。封闭板是一种压敏黏着剂，能很好与孔匹配，像是用机器人装置做出来的一样。

7.3.3 培养瓶和培养皿

培养瓶通常以它们的表面积命名（如25cm^{2}或175cm^2，通常分别缩写为T25或T175），而培养皿一般用直径大小命名（如3.5cm或9cm）。二者几乎全部为组织培养处理型聚苯乙烯（如

Corning)。玻璃瓶比塑料瓶有其优越性，因为通常来自标准的医药供应，所以玻璃瓶比塑料瓶的种类多。玻璃瓶应有：①适当的平面；②有密封性好和无毒衬垫的深螺旋帽；③浅层斜肩，以便于收集胰蛋白酶消化后的单层细胞和提高清洗效率。

培养皿相对便宜，操作方便，但更容易污染。它们一般用于克隆实验（参见23.10节）和高倍放大下的细胞学检测。一些培养瓶有一个易拉式顶口以方便伸入培养瓶内部，如挑取克隆（techno plastic product，TPP）。

7.3.4 高细胞产量

如果你需要的细胞量较大（如约 10^9 个HeLa宫颈癌细胞或 2×10^8 个MCR-5人二倍体成纤维细胞），仅靠增加常规培养瓶大小和数量颇为麻烦，在这种情况下，需要使用特制的器皿。多层细胞培养瓶（CellStack，Corning；Nunc Triple-Flask，Thermo Scientific）为增加表面积提供中间步骤（图7.6）。若需要更高的细胞产量，则要用大型的多表面扩增器或放在专用支架上的旋转培养瓶（参见21.2.2节）。若增加悬浮生长细胞的产量时，唯有增加培养基的体积，但要不断地搅动深层培养物，以及喷洒含5% CO_2 的气体（参见24.1.4节）。

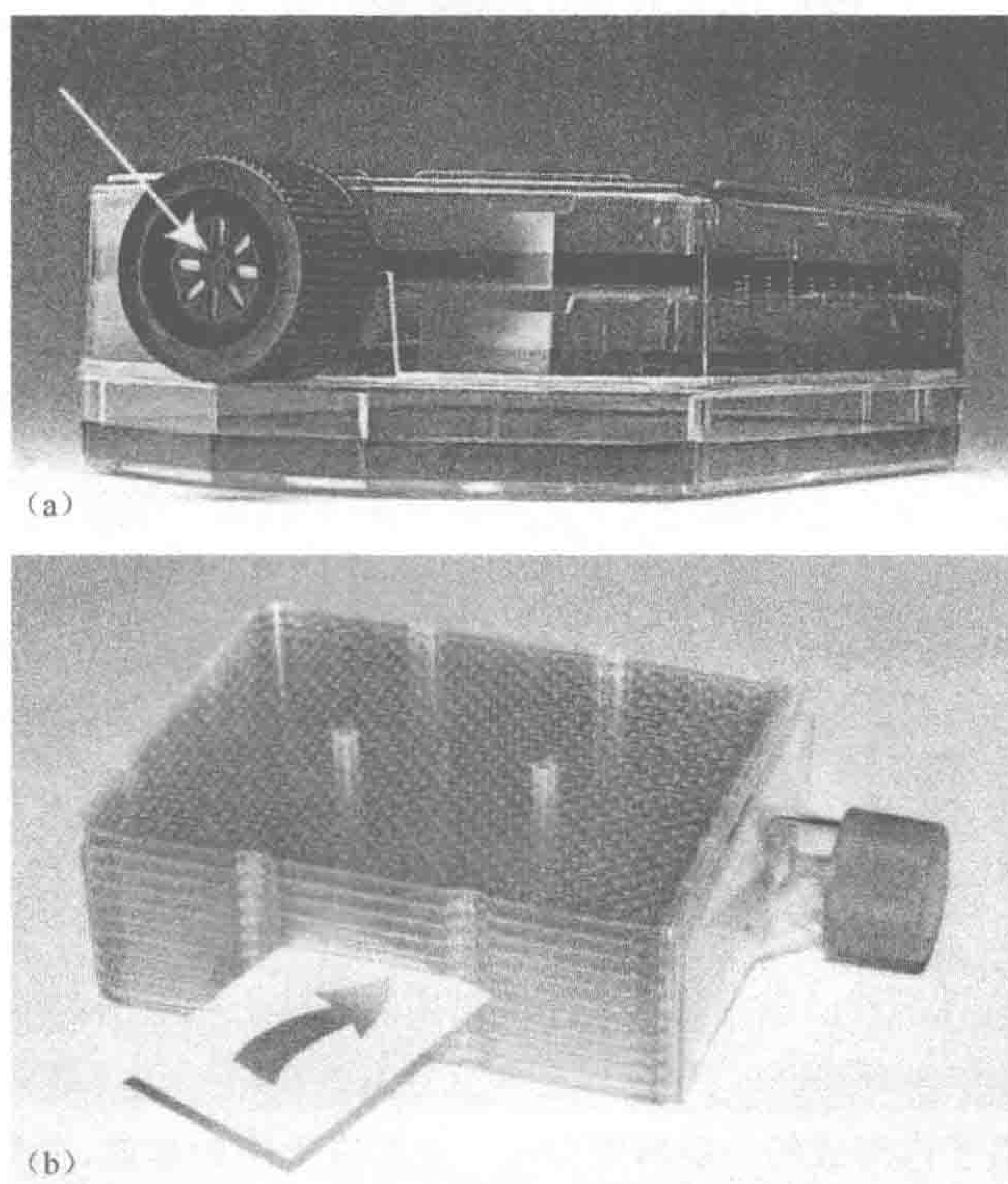


图7.6 多表面培养瓶。带有多个生长表面的培养瓶。（a）Nunc Triple-Flask培养瓶，具有3个面积均为 $80cm^2$ 的可同时接种细胞的生长表面。由于作为气相的头部空间较小，因此此培养瓶在 CO_2 培养箱内最好配用滤网帽（箭头所指）（图片由Nalge Nunc International 提供）。虽然总生长面积为 $240cm^2$，但是框架空间只相当普通的 $80cm^2$ 培养瓶；（b）具有 $1720cm^2$ 生长表面的Corning Hyper-Flask培养瓶，占用空间与 $175cm^2$ 培养瓶相同。箭头指的是生长表面之间的空气间隙，分隔生长的气体交换在此处进行（培养瓶由TAP Biosystems 提供）

7.3.5 悬浮培养

悬浮生长的细胞可以在各种未经细胞附着处理的无菌培养瓶、培养板和培养皿中生长。当需要搅拌以保持细胞悬浮时，可使用搅拌瓶。这种瓶子有各种尺寸可以使用，一般为玻璃材质（Bello；Integra；Techne；Wheaton）。通常用顶部驱动的悬浮桨或含磁铁的钟摆式搅拌器进行搅拌（图 7.7，另见图 12.7、图 21.1 和图 21.2）。为避免切应力带来的伤害，需保持在低转速（约 60r/min）。一般来说，尽管细胞培养规模增加时，使用搅拌方式效果会更好，但钟摆设计更有利于减小切应力。建立悬浮培养可用于细胞增殖，并能从培养瓶的一个侧臂反复取样，也可通过不断添加和移除培养基来维持培养物的稳定状态（参见 12.1.1 节和图 21.3）。

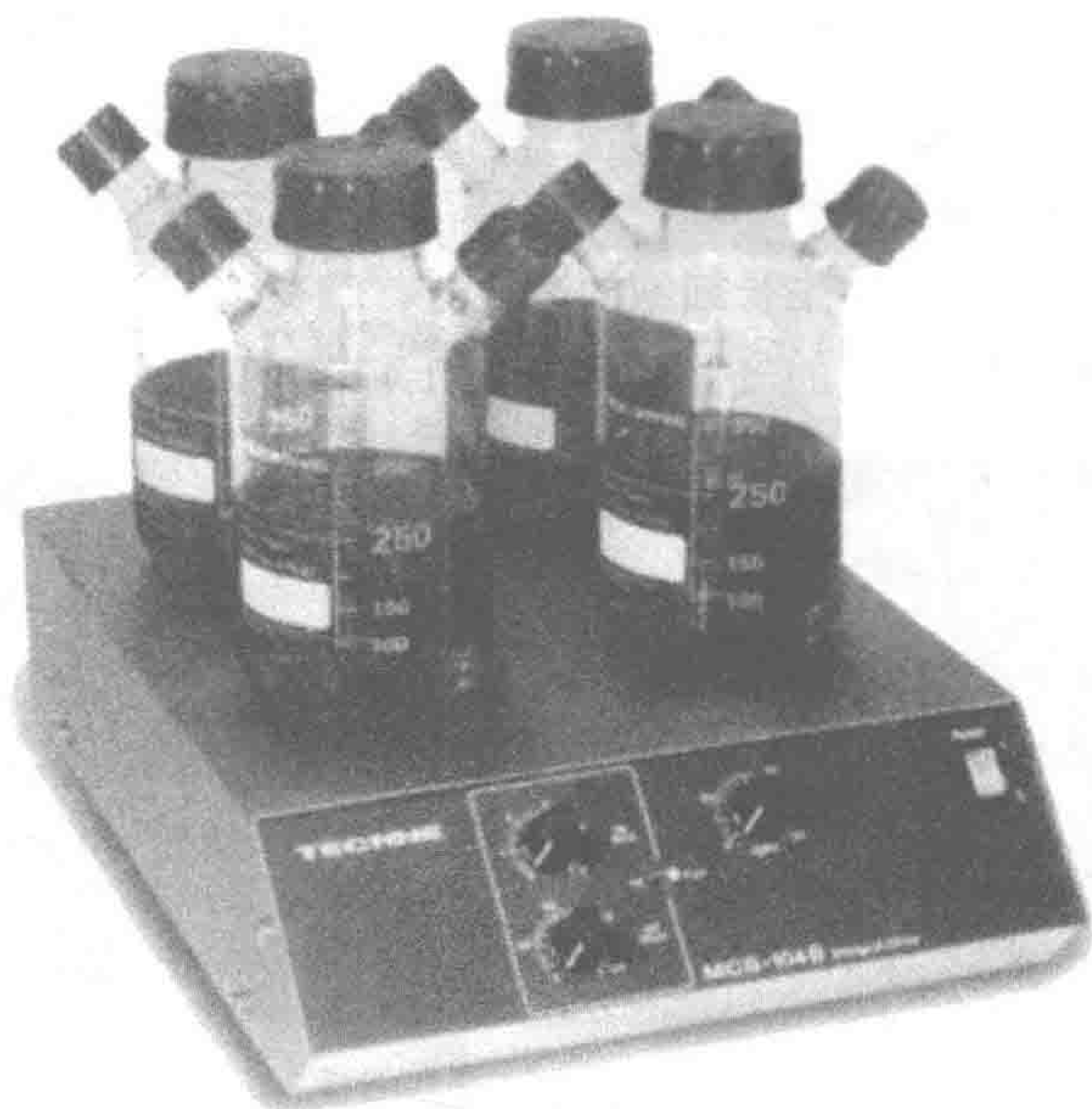


图 7.7 搅拌瓶。4 个装有 250mL 培养基的 500mL 小型搅拌瓶（Techne）和钟摆式搅拌器，培养瓶置于 1 个四位搅拌架上（另见图 4.20、图 12.7、图 21.1、图 21.2）（Bibby-Sterilin 提供）

7.3.6 通气

选用多孔培养皿和皮氏培养皿进行重复取样或扩增时，其上松散的盖子很容易使气体进入器皿里。因此它们是未密封的，需要一个含有一定浓度 CO_2 的潮湿环境（参见 8.2.2 节）。由于器皿的冷凝或搅动，液体在盖子内形成的一层薄膜会在一定程度上密封器皿，为防止这样的事情发生，可以使用内侧带有模压塑料支架的透气盖（图 7.8a 箭头）。如果需要完全密封，可用自黏膜（如 Alpha Laboratories；另见补充材料附录Ⅱ：Plate Sealers）把多孔培养皿完全密封起来。

可通过把培养瓶螺帽拧松一圈的办法使培养瓶内通气，通过这种方式，CO_2 培养箱中的 CO_2 可进入培养瓶内，产酸细胞系产生的过量 CO_2 也可排出培养瓶外，但若用带滤膜的盖子会更好，可以使瓶内外的气体保持平衡，保证 CO_2 扩散的同时不会受到污染（图 7.8b）。在非 CO_2 培养箱

或温室内仍需用密实帽或塞帽。

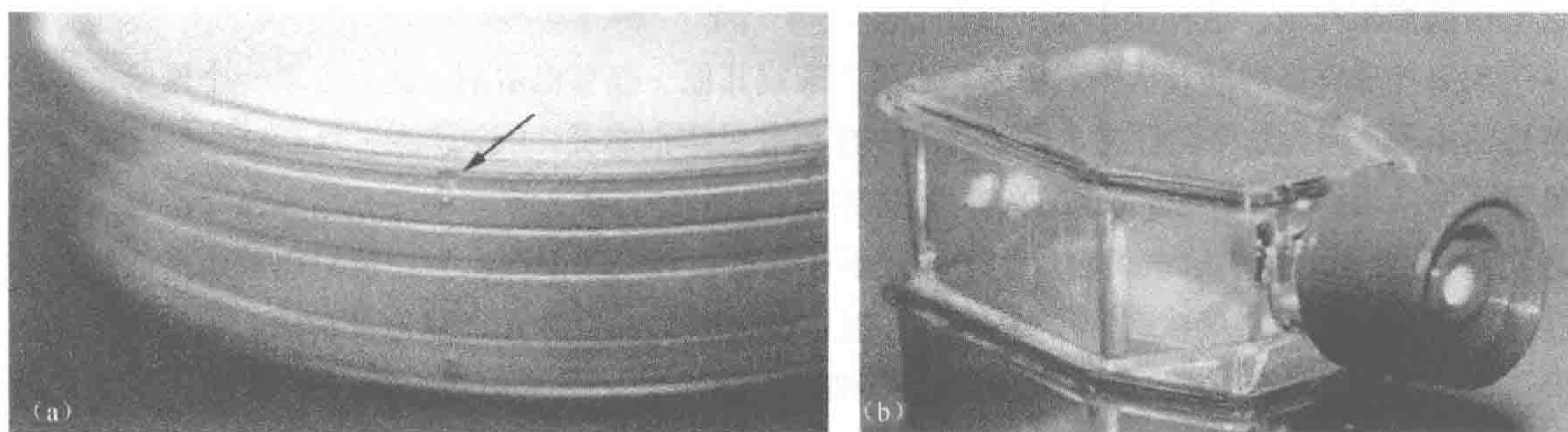


图 7.8　通气型培养皿和培养瓶。（a）通气型培养皿。培养皿盖子内侧顶面每相距 120°有一个小脊，提高了顶盖下面与底盘上缘的距离，防止液体薄膜（如冷凝液）密封盖子和降低换气效率；（b）$10cm^2$ 培养瓶的透气帽（Falcon，Corning）（另见图 7.6a）

7.3.7　取样和分析

如果需要将所用样品同时移走，并且以同样方式处理，那么用多孔板扩增培养物是理想的方法。相反，如果需要在不同时间快速处理样品，最好使用单独的器皿（如培养瓶、试管等）（图 7.9，另见 23.8 节）。通过有选择地移走多孔板上覆盖孔的一部分粘贴膜，可实现微量滴定板的单孔取样。另外，可把微量滴定板的某些孔取下来单独处理（Nunc）。

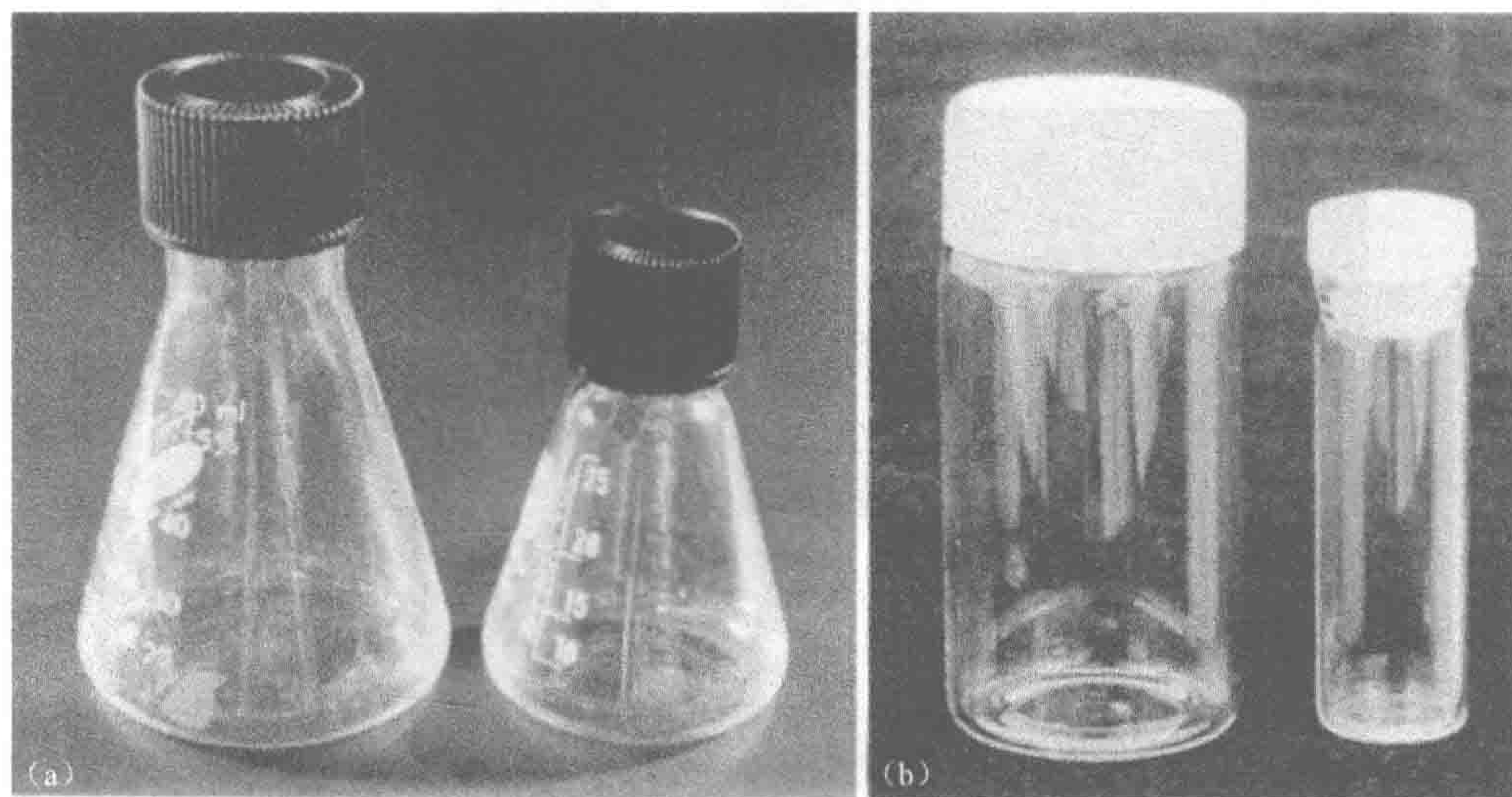


图 7.9　螺旋盖小瓶和培养瓶。（a）玻璃培养瓶适于扩繁培养物和储存样品，尤其当下游操作中不能使用塑料制品时，更是如此。此情况下螺旋帽好于瓶塞，因为前者可以防止泄漏和瓶颈污染；（b）闪烁管特别适合于同位素掺入研究，但装过闪烁液后，不能再用于细胞培养

用倒置显微镜对培养瓶、培养皿和多孔板进行低倍观察十分方便。然而，用相差显微镜观察微量滴定板时，相对微孔板直径，由于半月板大小的影响而变得困难；即便用相差显微镜观察的是 24 孔培养板，也只能满意地观察到中央的一部分孔，如果显微观察是你分析的主要部分，用

带网格的载玻片会很方便（参见18.4.3节，图18.3）。若用大型旋转培养瓶，很难进行显微观察，这时需摘掉聚光镜，这样就不会产生相差。

如果处理样品时涉及丙酮、甲苯、乙酸乙酯或其他一些有机溶剂，就会出现一个聚苯乙烯溶解性的问题。因为这个问题常与组织处理中使用有机溶剂有关，所以Lux（Thermo Scientific）提供了一些抗溶解的Thermanox（TPX）塑料盖玻片，能刚好放入常规的多孔培养皿（不需用组织培养基）。然而，由于这些盖玻片的透光性不好且有紫外线抗渗性，应将材料面朝上把细胞封固在载玻片上，并用常规玻璃盖片封盖。

溶剂型或高热型抽提也要求使用玻璃器皿。无盖平口试管和Erlenmeyer培养瓶（无嘴），结合胶带和Oxoid塞使用既快捷又能完好保持在温湿CO_2受控环境中。常规玻璃闪烁管或“小瓶”底部平坦，因此也是很好的培养器皿。然而，一旦它们装过闪烁液，就不能再用于组织培养。

7.3.8 不均匀生长

有时，细胞会不均匀地随意分布在整个生长面上。开、关培养箱引起的振动、有故障的风扇电机或设备振动都会干扰培养基，导致培养瓶共振或驻波，使培养的单层细胞形成波纹图案，造成密度变化（图 7.10）。消除振动和尽量减少进入培养箱次数有助于减少不均匀生长。在装有培养板的托盘或盒子内放置一重物或用泡沫塑料将其与架子隔开，也有助于问题的缓解（Nielsen，1989）。污染物易隐藏于泡沫垫内，因此对这些泡沫垫必须认真清洗和灭菌。

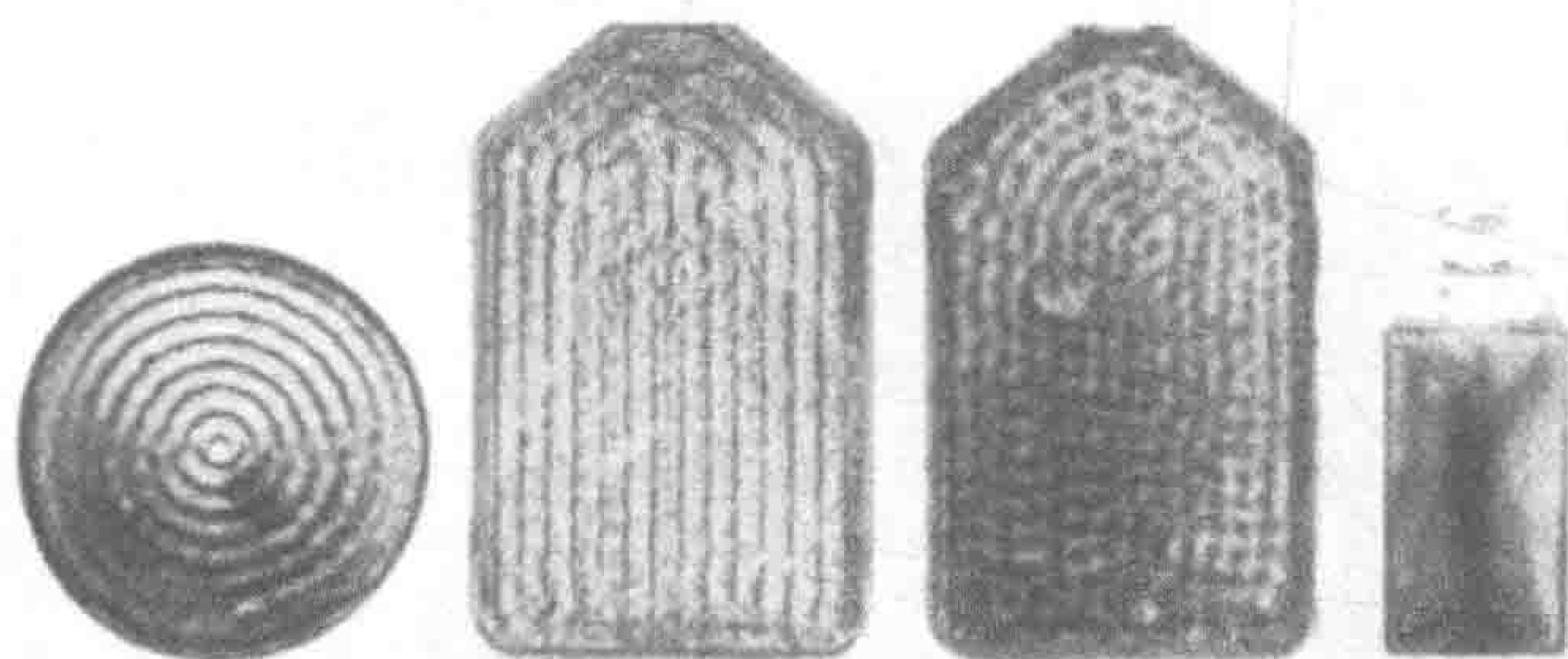


图7.10 非随机生长。培养单层在培养皿和培养瓶中形成的脊线。可能归因于培养箱中风扇电机的共振或培养箱门的开闭（Nunc提供）

7.3.9 成本

成本与便利之间需要权衡。例如，在相当的培养面积条件下，培养皿比培养瓶便宜，但前者易被污染，且需要控制湿度、CO_2浓度。不过，用培养皿培养材料时更易于观察和处理。

虽然苏打玻璃瓶的透光性不一定很好，但便宜，而且其上的细胞比在高级有机玻璃和透光性良好的玻璃上长得好，因为苏打玻璃不含铅。玻璃器皿的主要缺点是实验室准备起来烦琐，重复使用前，要进行认真清洗和重新消毒。现在，大多数实验室都用塑料器皿，乃出于方便的目的，另外其透光性好、质量也好。但一次性塑料培养器皿也是组织培养成本的主要组成部分。

7.4 特殊系统

7.4.1 渗透性支持物

半透性膜可用作透气材料，也能允许水和小分子（<500~1000Da）通过，这一特性常被用在一些大规模的生物反应器（参见21.4节和短篇综述21.1）和Corning Hyper-Flask（图7.6）中。在透水性底物上生长的细胞会增强O_2、CO_2和营养物的扩散性。同样，在多孔膜生长的细胞，有没有胶原包被都会促进气体交换和对营养的获取。

滤池嵌套 细胞锚定表面的渗透性可通过刺激基底膜诱导细胞产生极性，尤其是当渗透性膜包被有胶原、层粘连蛋白或纤连蛋白的情况下。这种极性在诱导分泌型上皮细胞和其他类型细胞充分表达功能方面极为重要（Chambard et al.，1987；Arthursson and Magnusson，1990；Mullin et al.，1997；Babayeva et al.，2013）。现在，可以利用的渗透性支持物包括各种规格的一次性滤池嵌套、材料和膜孔（参见补充材料中附录III：滤池嵌套和表20.3）。此外还有预先用胶原、层粘连蛋白或其他基质材料（如Matrigel，Corning）包被的嵌套可以使用。滤池嵌套已被广泛用于细胞间、细胞-基质间相互作用，以及分化和极化、跨上皮渗透和组织建模等研究中（参见25.3.6节）。

中空纤维 Knazek等（1972）开发了一种使细胞生长在塑料毛细管束外表面的技术（图7.11，见20.3.2节）。这种塑料允许培养基中的营养物质和可溶性气体通过毛细管扩散。贴敷在毛细管外的细胞将长到几个细胞深，类似于一个完整组织。中空纤维也可用在大规模生物反应器中（参见21.2.5节）。

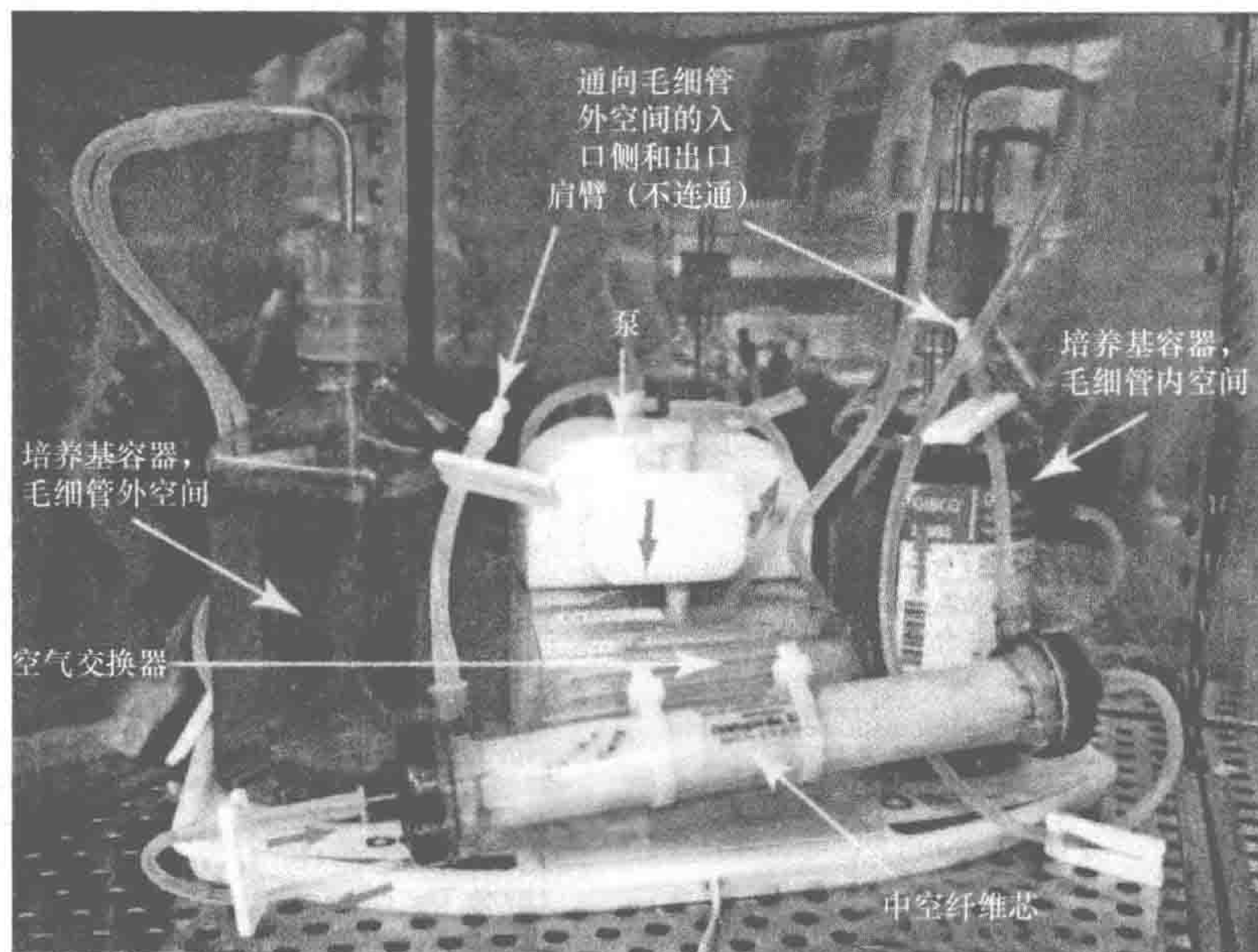


图7.11 中空纤维培养系统。渗透性塑料制成的一束中空纤维被包裹在一个透明塑料制成的夹层外腔中，通过外壳两侧的臂接种细胞和收集高分子产物。在培养期间，可通过气体交换器和蠕动泵从储存容器向外腔灌注，并通过外腔两端的连接处扩散到中空纤维的中央（FiberCell公司提供；另见图21.8；彩版24）



彩版24

7.4.2 三维基质

很显然，由于缺乏像体内组织那样的结构和细胞与细胞间的相互作用（参见 2.4.2 节、20.1 节和短篇综述 20.1），在连续传代培养过程中，细胞的许多形态和功能特征会丧失。这些缺陷激发了对胶原凝胶（Donglas et al.，1980）、纤维素海绵（或单独使用或胶原包被后使用）（Leighton et al.，1968）、Gelfoam（参见 20.3.1 节）等三维基质的探索和开发。纤维蛋白凝块是最早用于原代培养的基质之一，目前仍作为粗血浆凝块（参见 11.3.1 节）或作为混合有凝血酶的纯纤维蛋白原使用。两个系统都可以在固-胶界面或凝胶内部形成三维凝胶，细胞可在其中迁移和生长（Leighton，1991）。

三维基质现在被广泛用于组织工程（Vunjak-Novakovic and Freshney，2006）。三维基质可以是无机物，如磷酸钙；或有机物，如 GelFoam、PLA 或 PGA（参见 20.3.20 节和短篇综述 20.1）。考虑到能允许细胞吸附、增殖和分化，要求这类基质或支架能在活体内降解并被内源性物质替代。

用聚苯乙烯、Sephadex、聚丙烯酰胺、胶原或明胶形成的微载体可以以磁珠形式支持悬浮生长中锚定依赖性细胞传代（参见 20.3.5 节，表 21.1，补充材料中附录III）。尽管技术上是三维的，生长于微载体上的细胞在功能上却表现出经磁珠曲率半径改造的二维单层。然而，有些微载体疏松多孔（参见 20.3.5 节、21.2.4 节），细胞可在基质孔隙内生长。藻酸盐珠的三维生长可通过包封作用实现，而不是基质的直接渗透（参见 20.3.8 节），从而允许高水平的细胞间相互作用、促进软骨细胞（参见方案 25.16-Su）和神经细胞（参见 20.3.10 节）的分化，现通过杂交瘤技术用来提高抗体产量（Zimmermann et al.，2003）。

参考文献

Amable P, Butler M. (2008). Cell metabolism and its control in culture. In CastilhoL, MoraesA, AugustoE, ButlerM (eds.), *Animal cell technology: From biopharmaceuticals to gene therapy*. New York: Garland, pp. 75−110.

Artursson P, Magnusson C (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* **79**:595–600.

Babayeva S1, Rocque B, Aoudjit L, ZilberY, Li J, Baldwin C, Kawachi H, Takano T, Torban E (2013). Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes. *J. Biol. Chem.* **288**:24035−24048.

BelinV, Rousselle P (2006). Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. *Protein Exp. Purif.* **48**:43−48.

BelkaidW, Thostrup P, Yam PT, Juzwik CA, Ruthazer ES, Dhaunchak AS, Colman DR (2013). Cellular response to micropatterned growth promoting and inhibitory substrates. *BMC Biotechnol.* **13**:86.

Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M, Taylor-Papadimitriou J (1992). Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells:The role of the alpha 2 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **102**:437–446.

Bettega D, Calzolari P, Doglia SM, Dulio B, Tallone L, Villa AM (1998). Technical report: Cell thickness measurements by confocal fluorescence microscopy on C3H10T1/2 and V79 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**:397−403.

Birnie GD, Simons PJ (1967). The incorporation of H-thymidine and H-uridine into chick and mouse embryo cells cultured on stainless steel. *Exp. Cell Res.* **46**:355–366.

Bledsoe JG, Slack SM, Turitto VT (2004). Cyclic mechanical strain alters tissue-factor activity in rat osteosarcoma cells cultured on a titanium substrate. *J. Biomed. Mater. Res. A* **70**:490−496.

Carney DN, Bunn PA, Gazdar AF, Pagan JA, Minna JD (1981). Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3185–3189.

Chambard M., Mauchamp J, Chaband O (1987). Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: Modulation by thyrotropin. *J. Cell Physiol.* **133**:37–45.

Chen YC, Lee DC, Hsiao CY, Chung YF, Chen HC, Thomas JP (2009). The effect of ultra-nanocrystalline diamond films on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials* **30**:3428−3435.

Colombo E, Calcaterra F, Cappelletti M, Mavilio D, Della Bella S (2013). Comparison of fibronectin and collagen in supporting the isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood. *PLoS One* **8**(6):e66734.

Corbett GT, Roy A, Pahan K (2013). Sodium phenylbutyrate en-

hances astrocytic neurotrophin synthesis via protein kinase C (PKC)-mediated activation of cAMP-response element-binding protein (CREB): Implications for Alzheimer disease therapy. *J. Biol. Chem.* **288**:8299–8312.

Danen EH, Yamada KM (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J. Cell. Physiol.* **189**:1–13.

Douglas WHJ, McAteer JA, Dell'Orco RT, Phelps D (1980). Visualization of cellular aggregates cultured on a three-dimensional collagen sponge matrix. *In Vitro* **16**:306–312.

Feng G, Hicks P, Chang PL (2003). Differential expression of mammalian or viral promoter-driven gene in adherent versus suspension cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **39**:420–423.

Fiorino AS, Diehl AM, Lin HZ, Lemischka IR, Reid LM (1998). Maturation-dependent gene expression in a conditionally transformed liver progenitor cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **34**:247–258.

Folkman I, Moscona A (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**:345–349.

Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR (1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5217–5221.

Gabriel M, Strand D, Vahl CF (2012). Cell adhesive and antifouling polyvinyl chloride surfaces via wet chemical modification. *Artif. Organs* **36**:839–844.

Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S, Pitaru S, Offen D (2014). Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl. Med.* **3**:375–386.

Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I (1980). Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4094–4098.

Gottwald E, Lahni B, Thiele D, Giselbrecht S, Welle A, Weibezahn KF (2008). Chip-based three-dimensional cell culture in perfused micro-bioreactors. *J. Visual Exp.* **15**: 564.

Hofmann S, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Meinel L (2006). Tisue engineering of bone. In Vunjak-Novokovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 325–373.

Ireland GW, Dopping-Hepenstal PJ, Jordan PW, O'Neill CH (1989). Limitation of substratum size alters cytoskeletal organization and behaviour of Swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **13**:781–790.

Karamichos D, Funderburgh ML, Hutcheon AE, Zieske JD, Du Y, Wu J, Funderburgh JL (2014). A role for topographic cues in the organization of collagenous matrix by corneal fibroblasts and stem cells. *PLoS ONE* **9**(1):e86260.

Knazek RA, Gullino P, Kohler PO, Dedrick R (1972). Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth *in vitro*. *Science* **178**:65–67.

Kortesmaa J, Yurchenco P, Tryggvason K (2000). Recombinant laminin-8 (alpha4 beta1 gamma1); production, purification, and interactions with integrins. *J. Biol. Chem.* **275**:14853–14859.

Krishna Y, Sheridan C, Kent D, Kearns V, Grierson I, Williams R (2011). Expanded polytetrafluoroethylene as a substrate for retinal pigment epithelial cell growth and transplantation in age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* **95**:569–573.

Lao L, Tan H, Wang Y, Gao C (2008). Chitosan modified poly (L-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **66**:218–225.

Lechner JF, Haugen A, Autrup H, McClendon IA, Trump BF, Harris CC (1981). Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res.* **41**:2294–2304.

Leighton J (1991). Radial histophysiologic gradient culture chamber rationale and preparation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27A**:786–790.

Leighton J, Mark R, Rush G (1968). Patterns of three-dimensional growth in collagen coated cellulose sponge: Carcinomas and embryonic tissues. *Cancer Res.* **28**:286–296.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2002). Cell interaction and epithelial differentiation. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 31–63.

Macklis JD, Sidman RL, Shine HD (1985). Cross-linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro* **21**:189–194.

Macpherson I, Montagnier L (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**:291–294.

Mattotti M, Alvarez Z, Ortega JA, Planell JA, Engel E, Alcántara S (2012). Inducing functional radial glia-like progenitors from cortical astrocyte cultures using micropatterned PMMA. *Biomaterials* **33**:1759–1770.

McKeehan, W. L., & Ham, R. G. (1976a). Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* **71**:727–734.

Mullin JM, Marano CW, Laughlin KV, Nuciglio M, Stevenson BR, Soler AP (1997). Different size limitations for increased transepithelial paracellular solute flux across phorbol ester and tumour necrosis factor treated epithelial cell sheets. *J. Cell Physiol.* **171**:226–233.

Nicosia RF, Ottinetti A (1990). Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: A comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:119–128.

Nielsen V (1989). Vibration patterns in tissue culture vessels. *Nunc Bulletin 2* (May 1986; rev March 1989). Roskilde, Denmark: A/S Nunc.

Park K Phd, Du P, Subbiah R, Park JH. (2014). Vascular morphogenesis of human umbilical vein endothelial cells on cell-derived macromolecular matrix microenvironment. Tissue Eng Part A. 2014 Sep;20:2365-77. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0693.

Patel D, Haque A, Jones CN, Tuleouva N, Foster E, Vu T, Reddi AH, Revzin A (2014). Local control of hepatic phenotype with growth factor-encoded surfaces. *Integr. Biol.* (Cambridge) **6**:44–52.

Paul J (1975). *Cell and tissue culture*. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 172–184.

Ploss A, Khetani SR, Jones CT, Syder AJ, Trehan K, Gaysinskaya VA, Mu K, Ritola K, Rice CM, Bhatia SN (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:3141–3145.

Puck TT, Marcus PI (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**:432–437.

Richler C, Yaffe D (1970). The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* **23**:1–22.

Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2004). Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* **25**:3707–3715.

Sarang Z., Haig Y, Hansson A, Vondracek M, Wärngård L, Grafström RC (2003). Microarray assessment of fibronectin, collagen and integrin expression and the role of fibronectin-collagen coating in the growth of normal, SV40 T-antigen-immortalized and malignant human oral keratinocytes. *ATLA (Altnernatives to Laboratory Animals journal)* **31**:575–585.

Sattler GA, Michalopoulos G, Sattler GL, Pitot HC (1978). Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res.* **38**:1539–1549.

Shen B, Delaney MK, Du X (2013). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**:600–606.

Stampfer M, Halcones RG, Hackett AJ (1980). Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* **16**:415–425.

Vlodavsky I, Lui GM, Gospodarowicz D (1980). Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell* **19**:607–617.

Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.) (2006). *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Welle A, Weigel S, Bulut OD (2014). Patterning of polymeric cell culture substrates. *Methods Cell Biol.* **119**:35–53.

Westermark B (1978). Growth control in miniclones of human glial cells. *Exp. Cell. Res.* **111**:295–299.

Xie J, Pak K, Evans A, Kamgar-Parsi A, Fausti S, Mullen L, Ryan AF (2013). Neurotrophins differentially stimulate the growth of cochlear neurites on collagen surfaces and in gels. *Neural Regen. Res.* **8**:1541–1550.

Xu SL, Bi CW, Choi RC, Zhu KY, Miernisha A, Dong TT, Tsim KW (2013). Flavonoids induce the synthesis and secretion of neurotrophic factors in cultured rat astrocytes: A signaling response mediated by estrogen receptor. *Evid. Based Complement Altern. Med.* **2013**:127075.

Yamaguchi S, Ueno A, Akiyama Y, Morishima K (2012). Cell patterning through inkjet printing of one cell per droplet. *Biofabrication* **4**(4):045005.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**(3):281–292.

Zimmermann H, Hillgartner M, Manz B, Feilen P, Brunnenmeier F, Leinfelder U, Weber M, Cramer H, Schneider S, Hendrich C, Volke F, Zimmermann U (2003). Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials* **24**:2083–2096.

（徐存拴　译）

第8章

成分明确培养基及补充物

8.1 培养基的发展史

最初进行细胞培养是使用天然培养基，即组织提取物和体液，如鸡胚浸出液、血浆、血清、淋巴液等。随着可增殖细胞系的出现（L929 细胞、HeLa 等），以及它们的用途在许多实验室中的推广，对质量更加稳定的培养基的需求也不断地增加，由此出现了化学成分明确的培养基，它是通过对体液成分的分析及营养生物化学的研究而产生的。Eagle's Basal Medium（Eagle，1955）及后继的 Eagle's Minimal Essential Medium（MEM）（Eagle，1959）成为广泛采用的合成培养基，它们可以添加各种补充成分，如牛血清、人血清、马血清、蛋白水解物（如细菌蛋白胨和胰蛋白胨磷酸盐肉汤）及胚胎提取物。随着更多连续细胞系的出现，表明这些合成培养基完全可以满足绝大多数细胞的需求，尽管大多数成功开发的目标是取代血清（参见 9.2 节、9.6 节），以及针对不同类型的细胞制备最适宜的培养基（如 RPMI1640 适合于培养类成淋巴细胞系），或根据特殊的条件修正培养基（如 Leibovitz L15 不需要加入 CO_2 和 $NaHCO_3$ ）（Leibovitz，1963）。

分离和繁殖某种特殊类型的细胞可能需要一种选择性的无血清培养基（参见 9.2 节）；而为了得到产物所进行的细胞培养，如将细胞作为病毒繁殖的宿主，或将细胞用于非细胞特异性的分子生物学研究，则主要依赖于添加血清的 Eagle's MEM（Eagle，1959）及 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基、DMEM（Dulbecco and Freeman，1959）或者是现在更多使用的 RPMI1640（Moore et al.，1967）。然而许多工业化生产技术现在使用的是无血清培养基，这样做有利于产物的下游处理并可减少外来污染（参见 9.1 节），这通常意味着需要更复杂的配方和高纯度的成分（参见第 9 章）。在许多实验室还流行一种折中的方法：将一种成分复杂的培养基，如 Ham's F12（Ham，1965）与一种氨基酸和维生素含量较高的培养基（如 DMEM）混合使用，这样可以避免长时间的研发周期，又能产生一种对于原代培养及细胞系的繁殖有利的通用培养基，但这种培养基不具备特意设计的培养基的优化性和选择性（参见 9.6 节）。

本章以那些广泛使用、需要添加血清的培养基为例着重介绍培养基构成的一般原则，稍后再讨论无血清培养基的设计及应用问题（参见 9.5 节）。

8.2 物理化学特征

8.2.1 pH

大多数细胞系在 pH 7.4 生长最好，不同细胞株之间差别不大，但一些正常成纤维细胞系在 pH 7.4~7.7 生长最好，而一些转化细胞可能在 pH 7.0~7.4 生长得会更好些（Eagle，1973）。据报道，上皮细胞可以维持在 pH 5.5（Eisinger et al.，1979），但这一标准尚未得到普遍认可。对于一些特殊情况，可通过简单的生长实验（参见方案 23.7~方案 23.9）、接种率分析（参见 23.10 节）或特异性功能分析（参见 19.7 节）来确定适宜的 pH，这对特殊细胞的生长可能更为有利。

不论适宜的 pH 是多少，重要的是在整个生长周期中尽可能保持 pH 接近最适 pH。对于大多数细胞，高于 pH 7.7 和低于 pH 6.5 的环境使细胞生长减慢，在高于 pH 7.8 和低于 pH 6.0 时，细胞生存力会迅速丧失。转化细胞在生长至汇合后将降低培养基的 pH，导致乳酸释放，细胞将迅速凋亡（不一定是 pH 下降所致，更可能是伴随着营养和生长因子的枯竭和毒性物质的积累）。在这种情况下，经常更换培养基是困难的，如果细胞需要保持在这个密度，就需要进行灌注培养。一般来说，是在这个问题出现之前就进行传代培养（参见 12.5 节）。


彩版 22

酚红是常用的一种 pH 指示剂。在 pH 7.4 时，它呈红色；pH 7.0 时，变成橘红色；pH 6.5 时呈黄色；pH 低于 6.5 时，呈柠檬黄色；pH 7.6 时呈粉红色；pH 7.8 时呈紫红色（见彩版 22b）。由于颜色的判断有较高的主观性，制作一个标准色阶是很有用的：可以用灭菌的平衡盐溶液（BSS）及酚红按常规浓度配制，装在相同的瓶子里，上端剩余的空间也相同，一般在配制培养基时可以使用它。方案 8.1 是以 30mL 玻璃试管或玻璃瓶作为最终的容器。玻璃瓶的密闭性比聚苯乙烯瓶好，因为 CO_2 会通过塑料慢慢地扩散，培养基的 pH 将在储存过程中升高。试管或瓶子必须使用金属或其他不透气的盖子。

方案 8.1 pH 标准色阶的制备

概要

准备一系列玻璃瓶或样品管，内装有无菌培养基或 BSS 样品，将 pH 调节至 6.5~7.8。

材料

无菌

- Hanks 平衡盐溶液（HBSS），或 Eagle's MEM 10×浓缩液，不含碳酸盐或葡萄糖，含有 20mmol/L HEPES　　20mL
- 超纯水（UPW）　　200mL
- 1mol/L NaOH　　10mL
- 试管或常规容器，约 30mL　　7 个

- 玻璃瓶，如 100mL 带金属盖的医用培养瓶　　7个
- 加样器吸头　　100μL

非无菌

- pH 计
- 加样器吸头，10~100μL

操作步骤

1. 用 UPW 稀释 10×的浓缩液配制 HBSS 或培养基，pH 6.5 或稍低于 6.5，分装 20mL 至 7 个标记好的试管或常用容器中。
2. 使之在空气中平衡 30min。
3. 用 1mol/L NaOH 将各试管或容器中的液体分别调节至 pH 6.5、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8，以 pH 计测试。
4. 每种 HBSS 过滤除菌 15mL，先过滤的 5mL 用于冲洗滤器，后过滤的 5mL 收集分装至标记好的玻璃瓶内（参见方案 10.10）。
5. 拧紧瓶盖，存放在室温，放在容易观察的地方，可用白色或中性灰作背景。

8.2.2 CO_2 和碳酸盐

空气中 CO_2 的浓度是 0.04%，供气式温箱保持在 2%~10%（通常是 5%）。无论 CO_2 是在大气中还是浓度被提升后，它都以气体的形式溶解于培养基中，与 HCO_3^- 达到平衡，从而降低培养基的 pH，CO_2 的浓度越高，需要用于平衡的 HCO_3^- 越多。由于溶解的 CO_2、HCO_3^- 及 pH 之间是相互调节的，因此 CO_2 对细胞主要的直接作用难以确定。如同温度的作用一样，大气中 CO_2 的压力可直接调节溶解 CO_2 的浓度。这种调节作用产生 H_2CO_3，H_2CO_3 的解离按下列反应方程式进行：



$$H_2O+CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \quad (8.1)$$

由于 HCO_3^- 与大部分阳离子作用的解离常数都很低，因此又导致了重新结合，使培养基保持酸性。增加大气中 CO_2 的最终结果是降低 pH，所以要抵消提高 CO_2 压力所产生的作用可通过增加碳酸盐的浓度：



$$NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^- \quad (8.2)$$

增加 HCO_3^- 的浓度可迫使反应式（8.1）向左进行直至 pH 7.4 时达到平衡。如果用其他碱性物质（如 NaOH）来代替，最终结果是相同的：



$$NaOH+H_2CO_3 \rightleftharpoons NaHCO_3+H_2O \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^- + H_2O \quad (8.3)$$

等效的 HCO_3^- 浓度通常是利用不同的 CO_2 压力来实现的，表 8.1~表 8.3 列出了这些数据，可能是用 CO_2 和 HCO_3^- 的中间值，两者的浓度按照比例在不断地变化。由于许多培养基是以酸性溶液配制或者与一种缓冲液混合，在加入其他碱性物质替代了部分碳酸盐之后，如反应式（8.3）所示，预算再加入多少碳酸盐是困难的。第一次配制新的培养基，应加入特别指定的碳酸盐量，

然后将培养基置于一平皿中，在正确的 CO_2 浓度下于37℃平衡过夜，再以1mol/L NaOH 调节培养基至适宜的pH。如果是一种一直在工作中使用的培养基，可改变 HCO_3^- 的量以适应气体环境（表8.1），将培养基置于37℃平衡过夜。每一种培养基都有可参考的碳酸盐浓度和 CO_2 压力，以便达到正确的pH和渗透压；但由于配制方法的不同，可能会出现微小的差别。

表8.1 碳酸氢盐、CO_2、HEPES之间的相互关系

化合物	Eagle's MEM Hanks 盐溶液	低 HCO_3^-+缓冲液	Eagle's MEM Earle's 盐溶液	DMEM
$NaHCO_3$	4mmol/L	10mmol/L	26mmol/L	44mmol/L
CO_2	大气、培养过程产生	2%	5%	10%
HEPES* （如果需要）	10mmol/L	20mmol/L	50mmol/L	—

* 如果使用HEPES，就要减去相应的NaCl摩尔数，且必须检测渗透压

表8.2 平衡盐溶液

化合物		Earle's BSS		Dulbecco's PBS 不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}（D-PBSA）		Dulbecco's PBS 含 Ca^{2+}、Mg^{2+}		Hanks' BSS		Spinner 盐溶液（同S-MEM）	
	相对分子质量	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L
无机盐											
$CaCl_2$（无水）	111	0.02	0.18			0.2	1.80	0.14	1.3		
KCl	74.55	0.4	5.37	0.2	2.68	0.2	2.68	0.4	5.4	0.40	5.37
KH_2PO_4	136.1			0.2	1.47	0.2	1.47	0.06	0.4		
$MgCl_2·6H_2O$	203.3							0.1	0.5		
$MgSO_4·7H_2O$	246.5	0.2	0.81			0.98	3.98	0.1	0.4	0.20	0.81
NaCl	58.44	6.68	114.3	8	136.9	8	136.9	8	136.9	6.80	116.4
$NaHCO_3$	84.01	2.2	26.19					0.35	4.2	2.20	26.19
$Na_2HPO_4·7H_2O$	268.1			2.2	8.06	2.16	8.06	0.09	0.3		
$NaH_2PO_4·H_2O$	138	0.14	1.01							1.40	10.14
总盐			147.9		149.1		154		149.4		158.9
其他化合物											
D-葡萄糖	180.2	1	5.55					1	5.5	1.00	5.55
酚红	354.4	0.01	0.03					0.01	0.0	0.01	0.03
气相		5% CO_2				空气		空气		5% CO_2	

随着Good's缓冲液（如HEPES、Tricine）（Good et al.，1966）应用于细胞培养，人们生出了一种推测：既然 CO_2 对于稳定pH并非长久需求，是否可以省略？现已证实至少对于大部分细胞类型，特别是在细胞密度很低时，这一观点是不正确的（Itagaki and Kimure，1974）。尽管20mmol/L的HEPES可将pH控制在生理范围，但在大气中 CO_2 缺乏的情况下，反应式（8.1）将向左边进行，最终消除培养基中溶解的 CO_2 和几乎消除培养基中的 HCO_3^-。这一连串事件的出现均限制了细胞的生长，虽然我们还不太清楚细胞是否需要溶解 CO_2 或 HCO_3^-，或两者都需要。HCO_3^-、CO_2 及HEPES的浓度是相互影响的，必须受到控制（表8.1）。

丙酮酸盐用于培养基能使细胞增加内源性 CO_2 的产生，使它们不用依赖于外源性 CO_2，如 HCO_3^-。Leibovitz 的 L15 培养基（Leibovitz，1963）含有较高浓度的丙酮酸钠（550mg/L），但不含有 CO_2，并不需要提供 CO_2 气体。这种培养基的缓冲作用是通过相关的高氨基酸浓度来实现的。由于它不需要 CO_2，有时被推荐用于运送组织样品。β-甘油磷酸钠可用于那些不含 CO_2 和 HCO_3^-、可直接高温灭菌的培养基，在其中起缓冲作用（Waymouth，1979），Life Technologies 公司的一种非 CO_2 依赖型培养基也使用它。如果不使用 CO_2 对于降低价格、使用的方便性或其他原因很重要，那么这种方案可能就是最有价值的方案，当然只有在经过适当的测试之后才可以实施。

总而言之，如果使用开放式的培养瓶培养细胞，需要在含 CO_2 的气体环境中孵育，CO_2 的浓度与培养基中碳酸氢钠的量可达到平衡（表 8.1~表 8.3）。如果细胞处于中高密度（$\geqslant 1\times10^5$ 个/mL）或生长于密闭的培养瓶中，就不需要提供 CO_2 气体，同时培养基中的碳酸氢钠应保持在低浓度（约 4mmol/L），如果细胞可产生大量酸性产物，就应特别注意这一点。而当细胞处于低密度状态（如克隆化培养）或进行某些原代培养时，必须在密闭的培养瓶中加入 CO_2。在需要通气的时候，可拧松瓶盖或使用一种 CO_2 可渗透的瓶盖（参见图 7.8），这样既可与 CO_2 达到平衡，也可在高酸性时使 CO_2 逸出。

8.2.3 缓冲作用

培养基在以下两种情况下都能起到缓冲作用：①打开培养皿，这时 CO_2 逸出引起 pH 升高（参见 8.2.2 节）；②转化细胞系在高细胞浓度时 CO_2 和乳酸过量产生，pH 下降。也许可将某种缓冲液与培养基混合，使 pH 稳定，但在第 1 种情况下，有些细胞仍然需要外源性 CO_2，特别是在低细胞浓度时，以避免培养基中溶解的 CO_2 和碳酸盐完全丢失。尽管碳酸盐缓冲液在生理 pH 范围的缓冲能力很弱，但由于它的低毒性、低价格及营养方面的益处，仍然比其他缓冲液使用得多。HEPES 是一种 pH 在 7.2~7.6 时缓冲能力较强的缓冲液（图 8.1），使用浓度是 10mmol/L 或 20mmol/L。已知在有外源性 CO_2 存在的情况下，HEPES 的浓度必须是碳酸盐浓度的两倍才能保证足够的缓冲力（表 8.1）。在作者的实验室，使用 Ham's F12 培养基，含 20mmol/L HEPES、8mmol/L 碳酸盐，外加 2% CO_2，已成功地用于多种细胞系的培养。它可以保证从温箱里取出微孔板或其他多孔培养板时，pH 不会过度升高，而对 HEPES 的需求最小；因为 HEPES 有毒性，价格也比较高。

8.2.4 氧气

气相中另外一个重要的成分是氧气。虽然大部分细胞在体内呼吸时需要氧气，但培养中的细胞常进行糖酵解，其中还有许多是厌氧生长，如转化的细胞。然而，培养依然需要氧气（Fleischaker and Simskey，1981），曾试图加入一些 O_2 的载体，如全氟化碳（Radisic et al.，2006）或血红蛋白（Chen and Palmer，2008），取得了一些成功，但没有普遍意义，细胞主要还是利用溶解的 O_2，而溶解的 O_2 可能产生毒性，导致自由基水平的升高。因此如何提供正确的 O_2 压力总是在既要满足细胞呼吸的需要，又要避免毒性产生两者之间进行协调。协调的策略包括增加和减少 O_2 水平

表 8.3　常用培养基

组分	MEM（Eagle, 1959）	DMEM（Dulbecco and Freeman, 1959）	F12（Ham, 1965）	DMEM/F12（Bames and Sato, 1980）	α-MEM（Stanners et al., 1971）	CMRL1066（Parker et al., 1957）	RPMI1640（Moore et al., 1967）	M199（Morgan et al., 1950）	L15（Leibovitz, 1963）	McCoy's 5A（McCoy et al., 1959）	MB752/1（Waymouth, 1959）
氨基酸类											
L-丙氨酸			1.0E-04	5.0E-05	2.8E-04	2.8E-04		2.8E-04	2.5E-03	1.5E-04	
L-精氨酸	6.0E-04	4.0E-04	1.0E-03	7.0E-04	6.0E-04	3.3E-04	1.1E-03	3.3E-04	2.9E-03	2.0E-04	3.6E-04
L-天冬酰胺			1.0E-04	5.0E-05	3.3E-04	3.8E-04	1.7E-03	3.0E-04	7.6E-05		
L-天冬氨酸			1.0E-04	5.0E-05	2.3E-04	2.3E-04	1.5E-04	2.3E-04		1.5E-04	4.5E-04
L-胱氨酸			2.0E-04	1.0E-04	5.7E-04	1.5E-03		5.6E-07	9.9E-04	2.0E-04	5.0E-04
L-半胱氨酸	1.0E-04	2.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	8.3E-05	2.1E-04	9.9E-05			6.3E-05
L-谷氨酸			1.0E-04	5.0E-05	5.1E-04	5.1E-04	1.4E-04	4.5E-04		1.5E-04	1.0E-03
L-谷氨酰胺	2.0E-03	4.0E-03	1.0E-03	2.5E-03	2.0E-03	6.8E-04	2.1E-03	6.8E-04	2.1E-03	1.5E-03	2.4E-03
甘氨酸		4.0E-04	1.0E-04	2.5E-04	6.7E-04	6.7E-04	1.3E-04	6.7E-04	2.7E-03	1.0E-04	6.7E-04
L-组氨酸	2.0E-04	2.0E-04	1.0E-04	1.5E-04	2.0E-04	9.5E-05	9.7E-05	1.0E-04	1.6E-03	1.0E-04	8.3E-04
L-羟脯氨酸						7.6E-05	1.5E-04	7.6E-05		1.5E-04	
L-异亮氨酸	4.0E-04	8.0E-04	3.0E-05	4.2E-04	4.0E-04	1.5E-04	3.8E-04	1.5E-04	9.5E-04	3.0E-04	1.9E-04
L-亮氨酸	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	4.0E-04	4.6E-04	3.8E-04	4.6E-04	9.5E-04	3.0E-04	3.8E-04
L-赖氨酸 HCl	4.0E-04	8.0E-04	2.0E-04	5.0E-04	4.0E-04	3.8E-04	2.2E-04	3.8E-04	5.1E-04	2.0E-04	1.3E-03
L-甲硫氨酸	1.0E-04	2.0E-04	3.0E-05	1.2E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	5.0E-04	1.0E-04	3.4E-04
L-苯丙氨酸	2.0E-04	4.0E-04	3.0E-05	2.2E-04	1.9E-04	1.5E-04	9.1E-05	1.5E-04	7.6E-04	1.0E-04	3.0E-04
L-脯氨酸			3.0E-04	1.5E-04	3.5E-04	3.5E-04	1.7E-04	3.5E-04		1.5E-04	4.3E-04
L-丝氨酸		4.0E-04	1.0E-04	2.5E-04	2.4E-04	2.4E-04	2.9E-04	2.4E-04	1.9E-03	2.5E-04	
L-苏氨酸	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	4.0E-04	2.5E-04	1.7E-04	2.5E-04	2.5E-03	1.5E-04	6.3E-04
L-色氨酸	4.9E-05	7.8E-05	1.0E-05	4.4E-05	4.9E-05	4.9E-05	2.5E-05	4.9E-05	9.8E-05	1.5E-05	2.0E-04
L-酪氨酸	2.0E-04	4.0E-04	3.0E-04	2.1E-04	2.3E-04	2.2E-04	1.1E-04	2.2E-04	1.7E-03	1.2E-04	2.2E-04
L-缬氨酸	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	3.9E-04	2.1E-04	1.7E-04	2.1E-04	8.5E-04	1.5E-04	5.6E-04
维生素类											
P-氨苯甲酸						3.6E-07	7.3E-06	3.6E-07		7.3E-06	
L-抗坏血酸					2.5E-04	2.8E-04		2.8E-07		3.2E-06	9.9E-05

续表

组分	MEM（Eagle, 1959）	DMEM（Dulbecco and Freeman, 1959）	F12（Ham, 1965）	DMEM/F12（Bames and Sato, 1980）	α-MEM（Stanners et al., 1971）	CMRL1066（Parker et al., 1957）	RPMI1640（Moore et al., 1967）	M199（Morgan et al., 1950）	L15（Leibovitz, 1963）	McCoy's 5A（McCoy et al., 1959）	MB752/1（Waymouth, 1959）
维生素类											
生物素			3.0E-08	1.5E-08	4.1E-07	4.1E-08	8.2E-07	4.1E-08		8.2E-07	8.2E-08
维生素 D_2								2.5E-07			
氧化胆碱	7.1E-06	2.9E-05	1.0E-04	6.4E-05	7.1E-06	3.6E-06	2.1E-05	3.6E-06	7.1E-06	3.6E-05	1.8E-03
叶酸	2.3E-06	9.1E-06	2.9E-06	6.0E-06	2.3E-06	2.3E-08	2.3E-06	2.3E-08	2.3E-06	2.3E-05	9.1E-07
myo-肌醇	1.1E-05	4.0E-05	1.0E-04	7.0E-05	1.1E-05	2.8E-07	1.9E-04	2.8E-07	1.1E-05	2.0E-04	5.6E-06
维生素 K_3								6.9E-08			
烟酰胺	8.2E-06	3.3E-05	3.3E-07	1.7E-05	8.2E-06	2.0E-07	8.2E-06	2.0E-07	8.2E-06	4.1E-06	8.2E-06
烟酸								2.0E-07		4.1E-06	
D-偏多酸钙	4.2E-06	1.7E-05	2.0E-06	9.4E-06	4.2E-06	4.2E-08	1.1E-06	4.2E-08	4.2E-06	8.4E-07	4.2E-06
吡哆醛	4.9E-06	2.0E-05	3.0E-07	1.0E-05	4.9E-06	1.2E-07		1.2E-07		2.5E-06	
吡哆醇			3.0E-07	1.5E-07		1.2E-07	4.9E-06	1.2E-07		2.4E-06	4.9E-06
核黄素	2.7E-07	1.1E-06	1.0E-07	5.8E-07	2.7E-07	2.7E-08	5.3E-07	2.7E-08	1.9E-07	5.3E-07	2.7E-06
硫胺素	3.0E-06	1.2E-05	1.0E-06	6.4E-06	3.0E-06	3.0E-08	3.0E-06	3.0E-08	2.4E-06	5.9E-07	3.0E-05
单磷酸硫胺素										4.8E-06	
维生素 E								2.3E-08			
维生素 A 乙酸酯								3.5E-07			
维生素 B_{12}			1.0E-06	5.0E-07	1.0E-06		3.7E-09				1.5E-07
抗氧化剂类											
谷胱甘肽						3.0E-05	3.0E-06	1.5E-07		1.5E-06	4.5E-05
无机盐类											
$CaCl_2$	1.8E-03	1.8E-03	3.0E-04	1.1E-03	1.8E-03	1.8E-03		1.3E-03	1.3E-03	9.0E-04	8.2E-04
KCl	5.3E-03	5.3E-03	3.0E-03	4.2E-03	5.3E-04	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	2.0E-03
KH_2PO_4								4.4E-04	4.4E-04		5.9E-04
$MgCl_2$					1.2E-01						1.2E-03
$MgSO_4$	8.1E-04	8.1E-04	6.0E-04	7.0E-04	8.1E-04	8.1E-04	4.0E-04	8.1E-04	1.6E-03	8.1E-04	8.1E-04
NaCl	1.16E-01	1.09E-01	1.28E-01	1.19E-01	1.16E-01	1.16E-01	1.03E-01	1.16E-01	1.37E-01	1.1E-01	1.0E-01

续表

组分	MEM（Eagle, 1959）	DMEM（Dulbecco and Freeman, 1959）	F12（Ham, 1965）	DMEM/F12（Bames and Sato, 1980）	α-MEM（Stanners et al., 1971）	CMRL1066（Parker et al., 1957）	RPMI1640（Moore et al., 1967）	M199（Morgan et al., 1950）	L15（Leibovitz, 1963）	McCoy's 5A（McCoy et al., 1959）	MB752/1（Waymouth, 1959）
无机盐类											
$NaHCO_3$	2.6E-02	4.4E-02	1.4E-02	2.9E-02	2.6E-02	2.6E-02	2.3E-02	2.6E-02		1.3E-02	2.7E-03
NaH_2PO_4	1.0E-03	9.1E-04		4.5E-04		1.0E-03				4.2E-03	
Na_2HPO_4			1.0E-03	5.0E-04			5.6E-03	4.0E-04	1.6E-03		2.1E-03
微量元素类											
$CuSO_4·5H_2O$			1.6E-08	7.8E-09							
$Fe(NO_3)_3·9H_2O$		2.5E-07		1.2E-07							
$FeSO_4·7H_2O$			3.0E-06	1.5E-06							
$ZnSO_4·7H_2O$			3.0E-06	1.5E-06							
碱基和核苷等											
腺嘌呤 SO_4								5.4E-05			
腺苷					3.7E-05						
AMP								5.8E-07			
ATP								1.8E-05			
胞嘧啶					4.1E-05						
脱氧腺苷					4.0E-05	4.0E-05					
脱氧胞苷					4.2E-05	3.8E-05					
脱氧鸟苷					3.7E-05	3.7E-05					
2-脱氧核糖								3.7E-06			
DNP						9.5E-06					
FAD						1.2E-06					
葡萄糖醛酸，Na						1.9E-05					
鸟嘌呤								1.6E-06			
鸟嘌呤核苷					3.5E-05						
次黄嘌呤			3.0E-05	1.5E-05				2.2E-06			
5-甲基脱氧胞苷						4.1E-07					
D-核糖								3.3E-06			
胸苷			3.0E-06	1.5E-06	4.1E-05	4.1E-05					
胸腺嘧啶								2.4E-06			

续表

组分	MEM（Eagle, 1959）	DMEM（Dulbecco and Freeman, 1959）	F12（Ham, 1965）	DMEM/F12（Bames and Sato, 1980）	α-MEM（Stanners et al., 1971）	CMRL1066（Parker et al., 1957）	RPMI1640（Moore et al., 1967）	M199（Morgan et al., 1950）	L15（Leibovitz, 1963）	McCoy's 5A（McCoy et al., 1959）	MB752/1（Waymouth, 1959）
碱基和核苷等											
TPN						1.3E-06					
尿嘧啶								2.7E-06			
尿苷					4.1E-05						
UTP						1.8E-06					
黄嘌呤								2.0E-06			
能量代谢类											
辅羟化酶						2.2E-06					
辅酶 A						3.3E-06					
D-半乳糖									5.0E-02		
D-葡萄糖	5.6E-03	2.5E-02	1.0E-02	1.8E-02	5.6E-03	5.6E-03	1.1E-02	5.6E-03		1.7E-02	2.8E-02
乙酸钠						6.1E-04		4.5E-04			
丙酮酸钠		1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03				5.0E-03		
脂类和前体											
胆固醇						5.2E-07		5.2E-07			
Ethanol(溶剂)						3.5E-04					
亚油酸		3.0E-07		1.5E-07							8.9E-05
硫辛酸			1.0E-06	5.1E-07	9.7E-07						
吐温-80						1.8E-05		1.8E-05			
其他化合物											
蛋白胨（mg/mL）										0.6	
酚红	2.7E-05	4.0E-05	3.2E-05	3.6E-05	2.9E-05	5.3E-05	1.3E-05	4.5E-05	2.7E-05	2.9E-05	2.7E-05
腐胺			1.0E-06	5.0E-07							
气相											
CO_2	5%	10%	2%	7%	5%	5%	5%	5%	空气	5%	5%

注：绝大多数浓度采用摩尔浓度，并以科学计数法表示，如 3.0E-2=3.0×10^{-2}=30mmol/L。给出的分子质量是母体化合物的分子质量；虽然一些配方中使用相应盐或含水化合物，但摩尔浓度仍是相同的

同名及缩略词：AMP=腺苷单磷酸；ATP=腺苷三磷酸；生物素=维生素 H；钙化醇=维生素 D_2；FAD=黄素腺嘌呤二核苷酸；硫辛酸(lipoic acid=thioctic acid)；甲萘醌=维生素 K_3；*myo*-肌醇=l-肌醇；烟碱=烟酰胺；烟碱酸=烟酸；吡哆醇=维生素 B_6；硫胺素=维生素 B_1；α-生育酚=维生素 E；视黄醇=维生素 A_1；TPN=三磷酸吡哆核苷酸；UTP=尿苷三磷酸；维生素 B_{12}=钴胺素

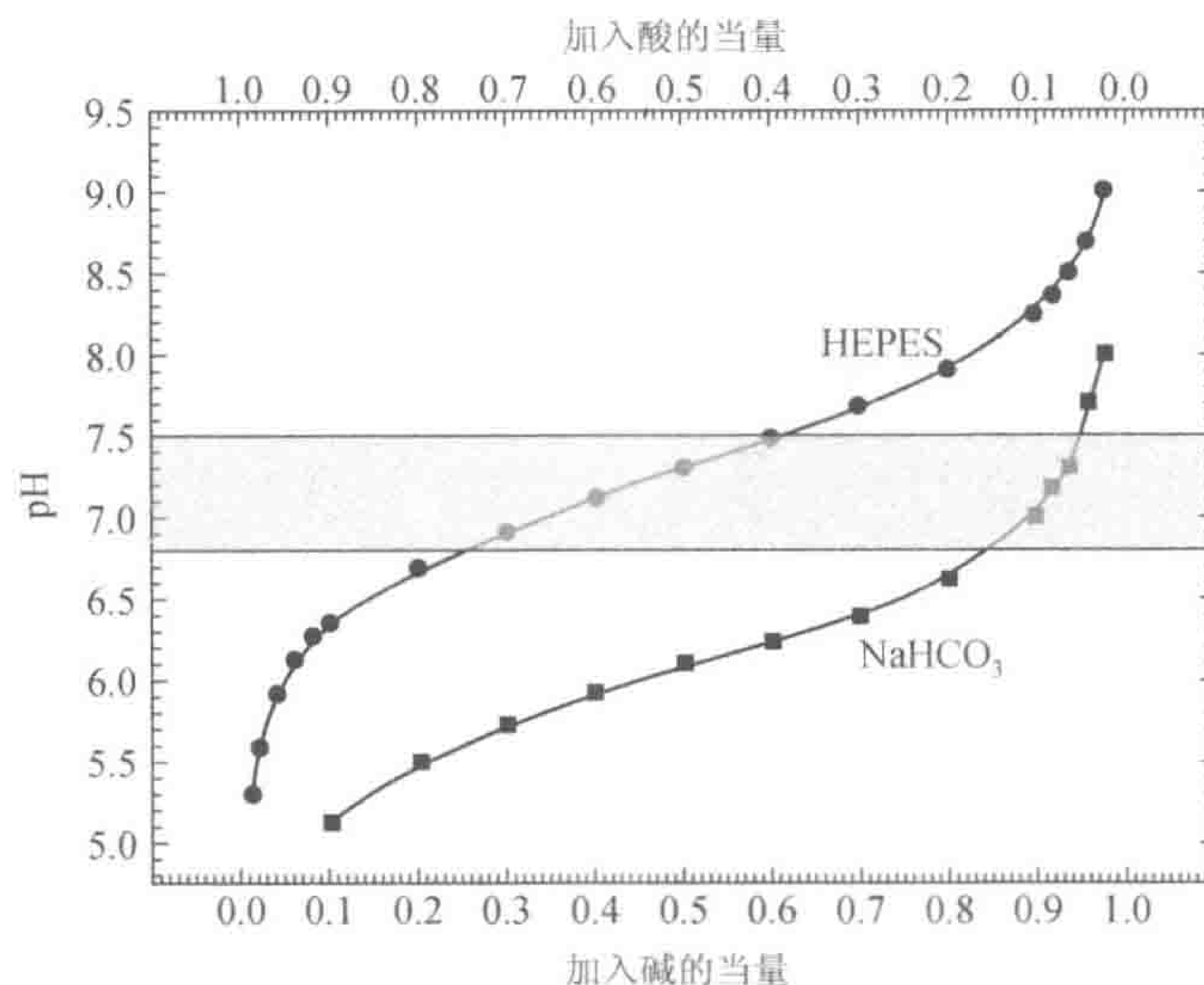


图 8.1 HEPES 和碳酸氢盐的缓冲能力。曲线显示在 HEPES 或碳酸氢钠存在的条件下，用酸（上轴）或碱（下轴）滴定时 pH 的变化情况。它表明在生理范围内（深的条块区域），加 HEPES（上部曲线）比加碳酸氢盐（下部曲线）对 pH 的缓冲力更有效（修改自 Shipman，1973）

两个方面，如在培养基中加入自由基的清除剂，包括谷胱甘肽、巯基乙醇或二硫苏糖醇。这些策略大部分已经被应用于实践中。有些温箱可以通过增加氮气的比例来控制 O_2 和 CO_2 浓度（如 HeraCell，Thermo Scientific；Sanyo）。

培养物对氧的需求是不一样的，主要差别存在于器官培养与细胞培养。大气环境或低氧压力条件（Balin et al.，1976）对于大部分细胞的培养是合适的；但对于一些器官培养，特别是来自晚期胚胎组织、新生机体组织或某些成体组织的器官，需要在高达 95% O_2 的气体环境中进行（Trowell，1959；de Ridder and Mareel，1978）。如此高水平的 O_2 需求可能不仅会产生扩散的问题，而这与器官培养物的几何形状及气体的穿透力有关（参见 20.2.1 节），同时也可反映出分化的细胞与迅速繁殖细胞之间的差异。O_2 的扩散可能在利用多孔微载体培养时受到限制（Preissman et al.，1997）（另见 21.2.4 节）。

大部分分散的细胞适合于低氧环境，而有些细胞，如人肿瘤细胞（Bertout et al.，2008）、人胚胎成纤维细胞（Balin et al.，1976）、间充质干细胞（MSC）（Ma et al.，2009；Dos Santos et al.，2013）、hESC（Lengner et al.，2010）、角膜缘上皮干细胞（Bath et al.，2013）及造血干细胞（Ishikawa and Ito，1988；Zhambalova et al.，2009）喜欢高氧的环境。McKeehan 等（1976）提出培养基对硒的需求与氧的毒性有关，因为硒是一种合成谷胱甘肽的辅助因子。对氧的耐受力及对硒的耐受力可能都是由血清提供的，因此在使用无血清培养基时，对氧压的控制似乎更为关键。归根到底，优化氧浓度的唯一途径是通过实验摸索，如同对任何一种营养物质，找到一个好处最大而毒性最小的浓度。不同类型的实验对氧的需求也可能不同，例如，克隆形成实验可能表现偏好于低氧浓度，而高密度的单层细胞培养可能偏好于较高的氧浓度。

许多不同参数将影响细胞外的 O_2 浓度（如气相中的浓度、培养基的深度、血清或其他添加剂的结合能力、温度），最终需要用微电极测量 O_2 浓度，这时它可能显示出不同的氧浓度并没有影响小鼠肝细胞的生存力，但高氧增加白蛋白的产生，特别是在基质胶存在的情况下（Buck et al.，2014）。

由于培养基的深度会影响氧在细胞中的扩散率（Buck et al.，2014），因此建议在静置培养时，

应保持培养基的深度为 2~5mm（0.2~0.5mL/cm^2）。有些类型的细胞，如支气管上皮细胞和角化细胞，培养于滤膜小孔插件中，处于空气-液体界面时可表现更好的分化状态（参见 20.3.9 节）。

短篇综述 8.1　低氧细胞培养*

在实验室体外培养哺乳动物细胞仍然需要在温箱中进行，温箱中的温度是 37℃，氧气的浓度就是大气中的浓度，大约是 21%，同时提供高于大气浓度的 CO_2，5%~10%。后者有助于 $CO_2/NaHCO_3$ 缓冲系统，此系统通常用于维持细胞培养基的生理 pH 在 6.8~7.4（参见 8.2.2 节、8.2.3 节）。然而经过测定，体内人体组织的溶解氧浓度永远不会高于 21%，大多数哺乳动物组织的溶解氧浓度是 2%~9%，这取决于组织与有氧血液供应的距离（Bertout et al.，2008；Haque et al.，2013）。然而，标准的细胞培养条件与体内的环境差距较大，多年前就已知道，哺乳动物细胞培养在类似于体内的低氧浓度下，其生长速度增加（Cooper et al.，1958；Richter et al.，1972）。胚胎学家通常也是在低氧环境下培养胚胎（Thompson et al.，1990；Catt and Henman，2000），已证明生长在约 2%的低氧环境中的人胚胎干细胞，其克隆的复原提高、染色体畸变减少，表型分化也比生长在含氧量正常环境中的胚胎干细胞要低（Forsyth et al.，2006）。

缺氧，被定义为氧气浓度小于 2%（Berrtout et al.，2008），如果对 O_2 的需求超过其供应量及组织的生理 O_2 张力不能维持，缺氧可能就会出现在组织内部。在非生理性情况下，细胞的 O_2 平衡过程受各种细胞内机制的高度调节，这让细胞“感觉”到 O_2（Brunelle et al.，2005；Mansfield et al.，2005），并能回应和适应。这种对缺氧的适应很大程度上受到缺氧诱导因子（HIF）的控制，在缺氧条件下它能控制特异基因的表达，并驱动或强烈影响许多重要的细胞内过程，包括代谢、衰老、自噬、造血、pH 调节、炎症、血管对缺氧的反应、血管生成（Majmundar et al.，2010；Koh et al.，2008）。

低氧条件和 HIF 对于人胚胎干细胞和间充质干细胞的多能性、细胞的增殖、细胞的分化都具有调节作用。考虑到在组织工程、再生医学、干细胞治疗方面的潜在用途，科研人员对此产生了极大的研究兴趣（Ma et al.，2009；Haqua et al.，2013）。

低氧对癌细胞的作用也是一个令人感兴趣的研究（Bertout et al.，2008），已知实体肿瘤的耗氧量低于相对应的正常组织（图 8.2），缺氧的程度及相关 HIF 在肿瘤组织中的表达显著影响肿瘤的进展。肿瘤缺氧的增加是肿瘤侵袭性表型的指标，它预示侵袭潜能增加、治疗抵抗增加及患者预后差（Brahimi Horn et al.，2007）。

科学家研究所描述的任何细胞内过程，仍然需要将细胞培养于缺氧或降低氧浓度的环境，已设计了帮助此实验的设备，现在可以很容易获得。最简单的选择是利用缺氧小室，它是个小型独立、密封的“盒子”，可以安装在任何标准温控实验室细胞培养箱内（图 8.3）。细胞培养物放在小室内，而后用所需的低氧气体混合物充入小室并灌满。缺氧小室是相对便宜的，除了需要正确的气体混合物，不需要其他特殊设备。由于它们的体积小容量小，所用的气体也很少，

* 剑桥大学，英国剑桥癌症研究所 Bob Geraghty 撰稿（bob.geraghty@cruk.cam.ac.uk）。

几乎不用维持，如果实验室只是偶尔进行小量的缺氧细胞培养，不乏是个好选择。

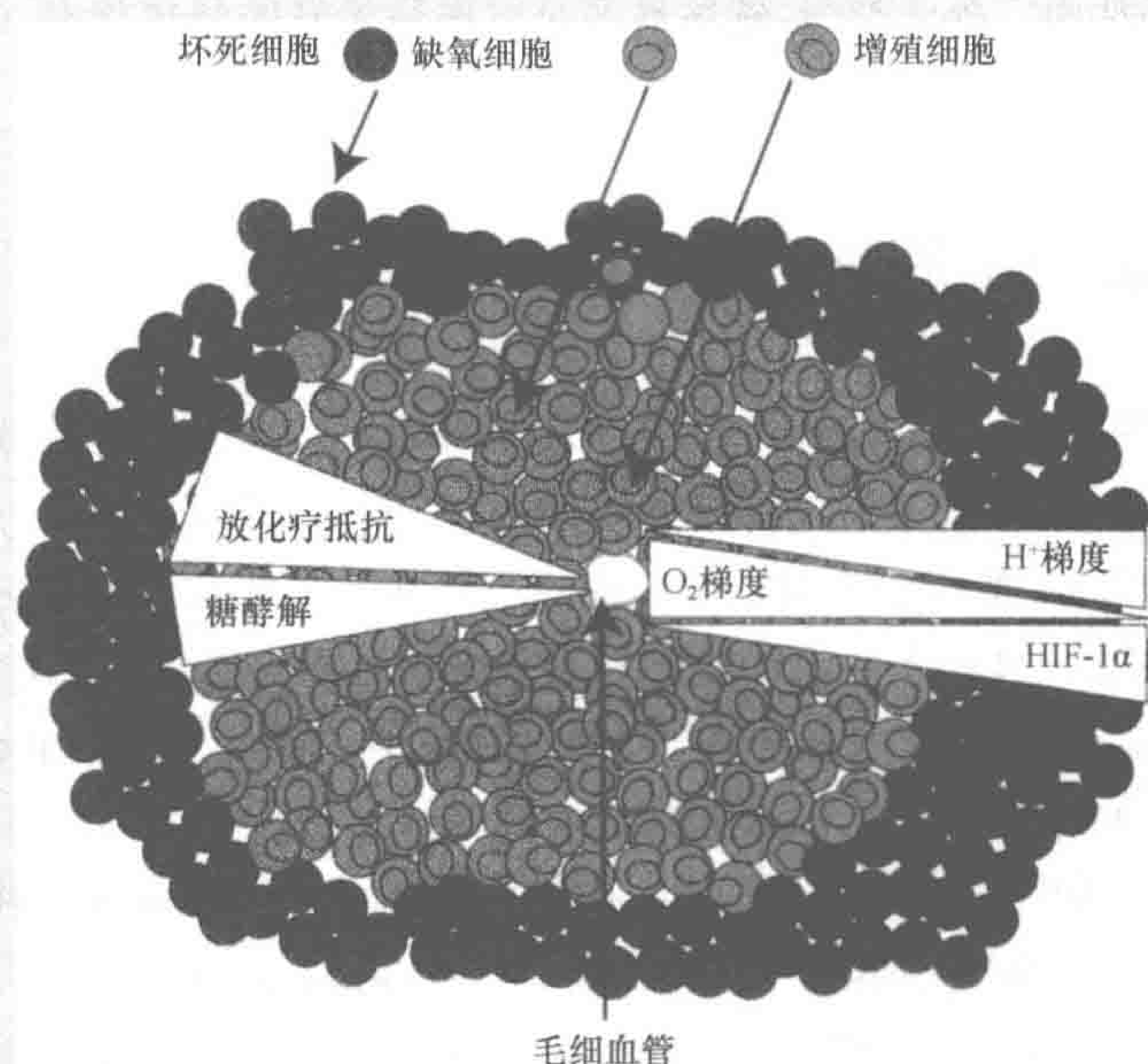


图 8.2 低氧肿瘤块的示意图。氧浓度随着与毛细血管距离的增大而减小，通常情况下，快速分裂的肿瘤细胞靠近毛细血管，随着与毛细血管距离的增大，不分裂细胞直至坏死细胞不断增加。这种细胞存活力的梯度变化与氧浓度梯度降低、HIF-1α 水平的增加、细胞外 pH 的降低，以及放化疗抵抗的增高相对应

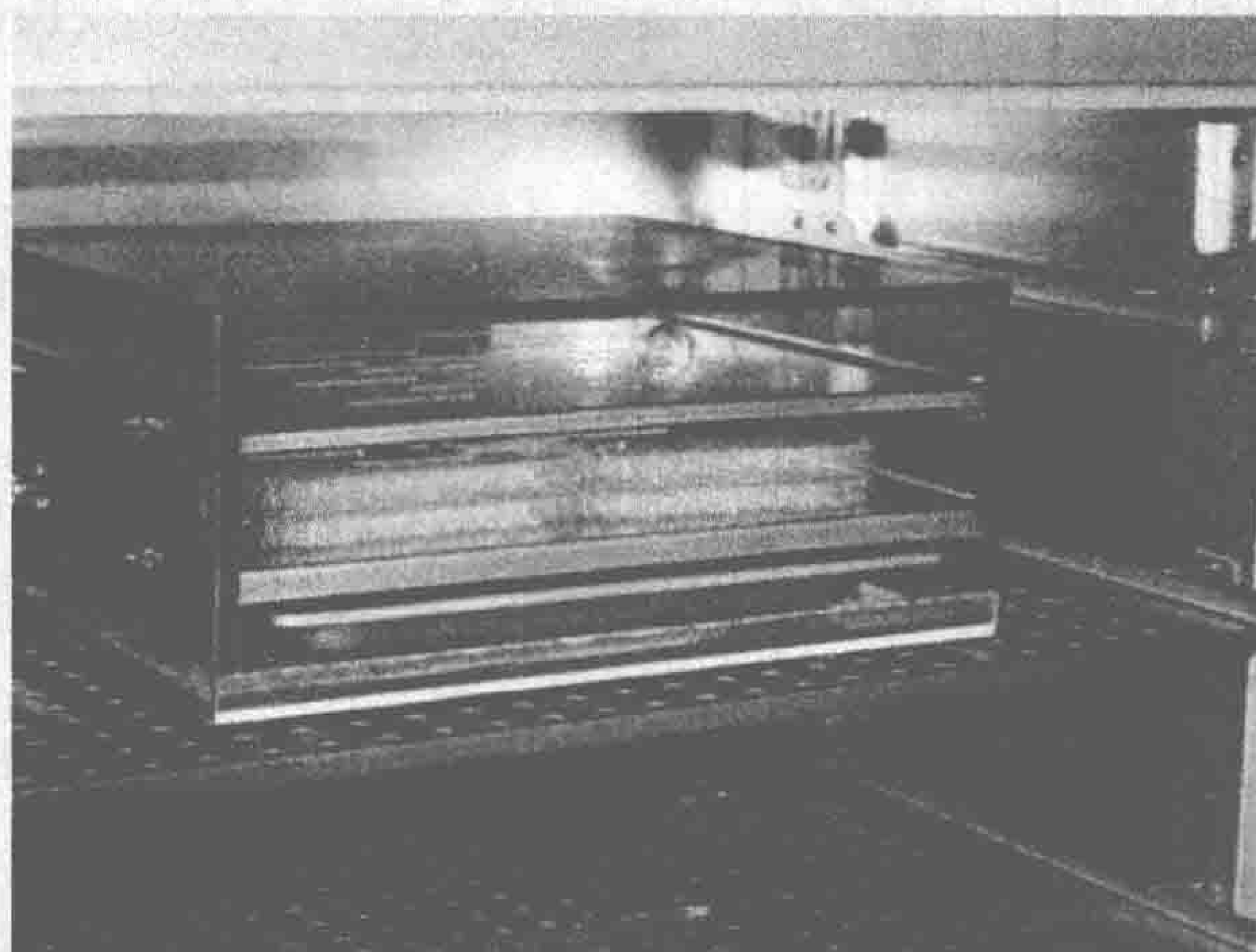


图 8.3 低氧培养室。特制密封的、可通气的、塑料的培养室（经 Reeve Irvine Institute 许可）

也可选择三气培养箱，这是一种完整的温箱，大小与标准实验室 CO_2 温箱类似，可以从绝大多数实验室 CO_2 温箱的制造商和供应商处获得。这类温箱需要提供 N_2 和 CO_2，N_2 用于替代温箱小室中 O_2 的水平，使氧气浓度低至 1%~2%并维持。三气培养箱常常分隔出内部小室，高达 3 个，每个均拥有自己的门（图 8.4），这使得一个小室被打开时，其余小室的气体不会跑掉，对于大批量实验，这是一个有利因素，它意味着细胞培养瓶可以从一个小室移出而不影响另一个小室的气相环境。分隔出小室也有助于减少气体使用量。现代三气培养箱通常具有内置

的自动净化功能，这是一个重要的考虑，特别对于那些需要培养具有潜在人类治疗用途的细胞的情况，这些细胞要做到绝对无微生物污染。使用抗微生物的铜或高铜合金作内室，也可如同小室内HEPA过滤那样，降低污染的风险。

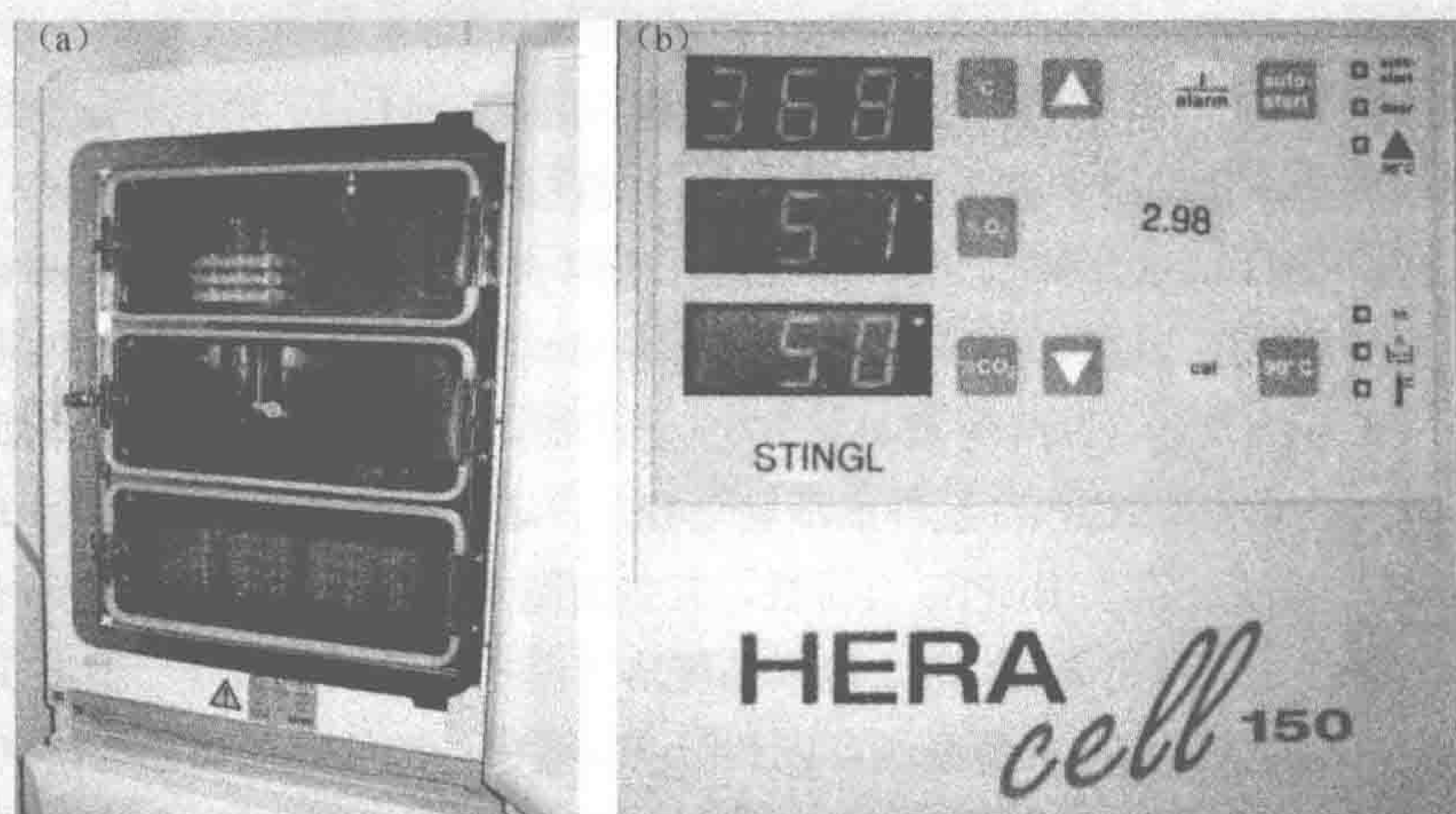


图8.4 三气培养箱。 置于Cancer Reseach UK Cambridge Institute的Heraeus HERA cell 150三气细胞培养箱（Thermo Scientific），可提供5%的O_2和CO_2的气体环境：（a）培养箱内有3个门；（b）可显示温度及O_2和CO_2的浓度（照片来源于Bob Geraghty）

使用小的缺氧小室，一个主要的缺点是，每次培养细胞需要在显微镜下观察、加药、换液、传代或进行各种其他操作，在操作过程中低氧的气相环境没有了，细胞暴露在大气的气体和温度环境中，尽管暴露的时间非常短，但有氧的环境会对缺氧细胞培养实验的结果产生不利的影响（Olbryt et al.，2014）。

使用缺氧工作站或“手套箱（glovebox）”（图8.5），可以使这些氧浓度的影响最小化。这个装置类似于Class Ⅲ BSC（见图6.5c），它可以完全与周围环境隔离开。可以从许多专业生产厂家处获得这种装置，包括Don Whitley Scientific、Baker Ruskinn、HypOxygen、Oxford Optronix、Plas Laboratories和BioSpherix。到目前为止这种类型的工作站是进行缺氧细胞培养工作的最佳选择。工作站大到足以执行整个细胞培养过程，在实验的任何阶段都不需要将细胞培养瓶移出而暴露于周围环境。要进入工作站小室只能通过手套洞或一个直通联锁，通过它们将培养基、试剂及耗材放入工作站。缺氧工作站的大小不同，从小型的台架安装（bench-mounted）装置到很大的组合工作站，前者用于偶尔的小批量缺氧细胞培养工作，后者由互联的小室组成，能够包纳整个细胞培养实验，包括孵育器、显微镜及活细胞成像装置。然而，缺氧工作站是很贵的，属于大件设备，需要提供专用的CO_2和氮气，操作时需要消耗大量的这些气体。通过手套洞操作细胞培养也有困难，不舒服。因为是密闭的装置，任何微生物污染都难以消除，这就需要关闭设备，或用化学熏蒸剂熏蒸，或拆开工作站用适宜的杀菌剂清洗内表面。然而，缺氧工作站具有维持的精确性、可控性，以及持续提供低氧或缺氧条件的能力，这意味着对于所有需要密切和连续再现体内条件的体外细胞培养实验，它依然是最好的选择。

要注意的另一个重要考虑因素是，用于低氧或缺氧培养工作的细胞培养基和试剂中的溶解

氧浓度很可能是接近于环境的，除非经过处理（Newby et al.，2005）。因此，培养基和试剂在使用前必须进行预处理或脱气。最简单的方法是将培养基放在缺氧小室或设定了所需氧浓度的温箱中，使之达到平衡（Newby et al.，2005）。为了制备大容量的预处理培养基，可使用专用的自动调节设备，如 HypoxyCOOL^{TM}（Baker Ruskinn），它能够在 3h 之内使≤4.5L 的细胞培养基降低氧浓度至 2%，同时还能维持培养基的无菌、温度、pH。细胞培养基也能通过充注无菌过滤的氮气来调节，氮气用于替代溶解的 O_2。用充注的方法，可以做到 15min 后使氧浓度大约降低至 1.5%，或 30min 后降至 0%，同时培养基的 pH 不受影响（Newby et al.，2005）。也可使用真空脱气的方法，这种方法可以去除培养基中≤85%的溶解气体，如果保持在真空条件下，培养基将不会再气化（Newby et al.，2005）。然而，由于所有溶解的气体都将被去除，也包括 CO_2，因此必须使用 HEPES 缓冲的细胞培养基，这种培养基不依靠 $CO_2/NaHCO_3$ 缓冲系统来维持 pH，但也要注意到 HEPES 有毒性，有些细胞（特别是在低细胞密度时）可能需要 $CO_2/NaHCO_3$ 缓冲系统（参见 8.2.2 节）。降低细胞培养基中溶解氧的另外一种方法是：加入葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶，这种双酶系统可以利用培养基中的溶解氧催化葡萄糖氧化形成葡萄糖酸，在 10min 以内使溶解氧降低至 1%（Baumann et al.，2008）。对于上述所有方法，都需要一个便携式溶解氧测定仪，具有无菌的电极可以精确地测定溶解氧浓度。

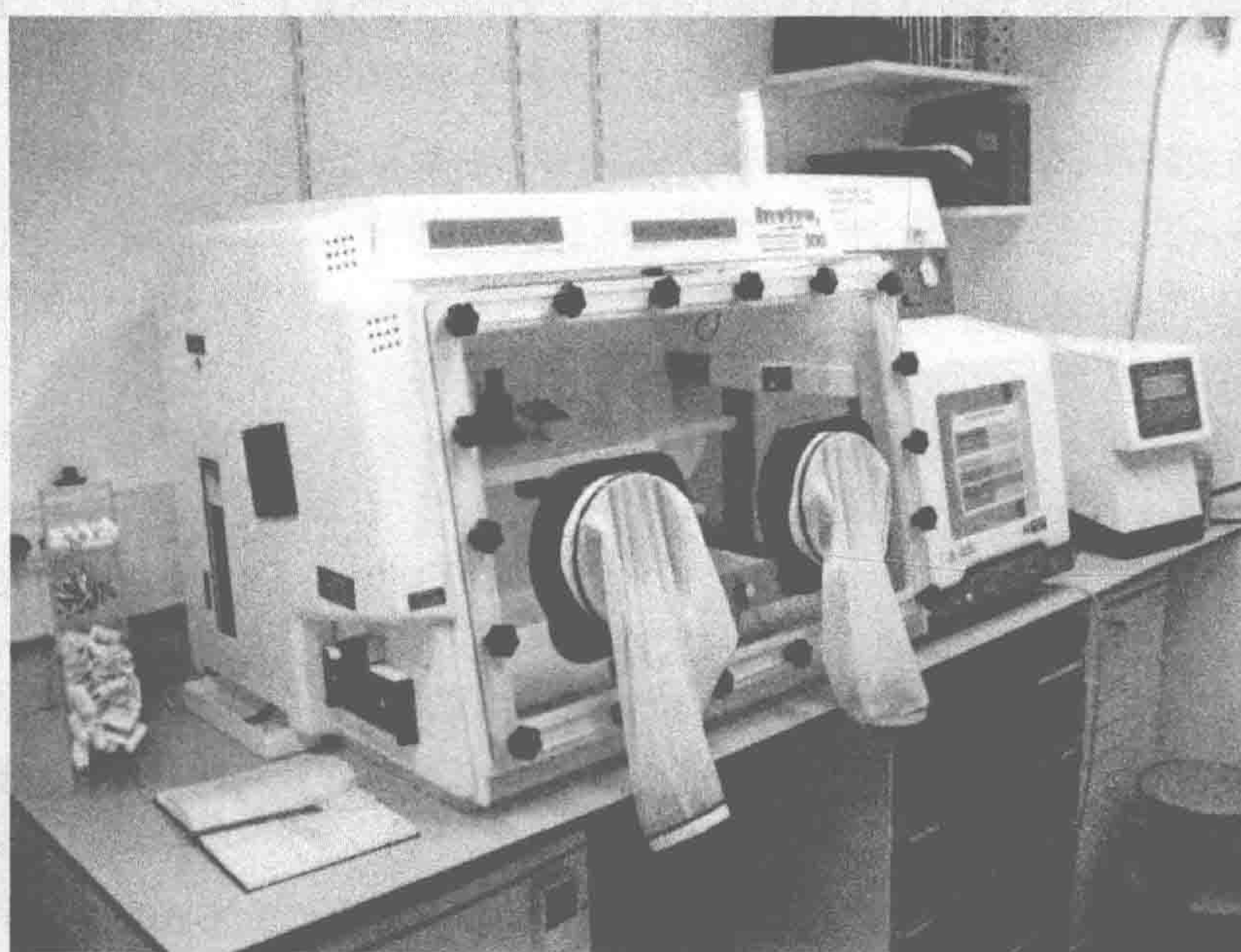


图 8.5 低氧工作站。放置在 Cancer Reseach UK Cambridge Institute 的一台 Ruskinn InvivO_2 500 低氧工作站（照片来源于 Cathy Pauley, CRUK CI Laboratory Management）

8.2.5 渗透压

大部分培养的细胞对渗透压的耐受力较大（Waymouth，1970）。人血浆的渗透压大约是

290mOsm/kg，可以合理地假设这个水平对于体外培养的人细胞是合适的，但可能对其他种属细胞不合适[如小鼠的渗透压约为 310mOsm/kg（Waymouth，1970）]。在实际工作中，渗透压为 260~320mOsm/kg 对大部分细胞都合适；但经过选择后必须保持在±10mOsm/kg 的范围，稍低浓度的培养基更适合于使用培养皿或培养板，因其可补偿孵育过程中水分的蒸发。调节渗透压通常是通过改变氯化钠的浓度而实现的，如为补偿不同的碳酸氢盐浓度（表 8.1、表 8.2）或因为添加了 HEPES 而改变。

渗透压一般是通过测量培养基冰点的降低值或蒸汽压力的上升值来确定的（图 8.6）。如果是自己配制培养基，渗透压的测定是一项很重要的质控步骤，因为它有助于防止配制过程中称量、稀释等方面的错误。如果在培养基的组分中添加某些成分，测定渗透压就更为重要。HEPES 和一些药物溶解于强酸、强碱，它们加入培养基后被中和，将会明显地影响培养基的渗透压。

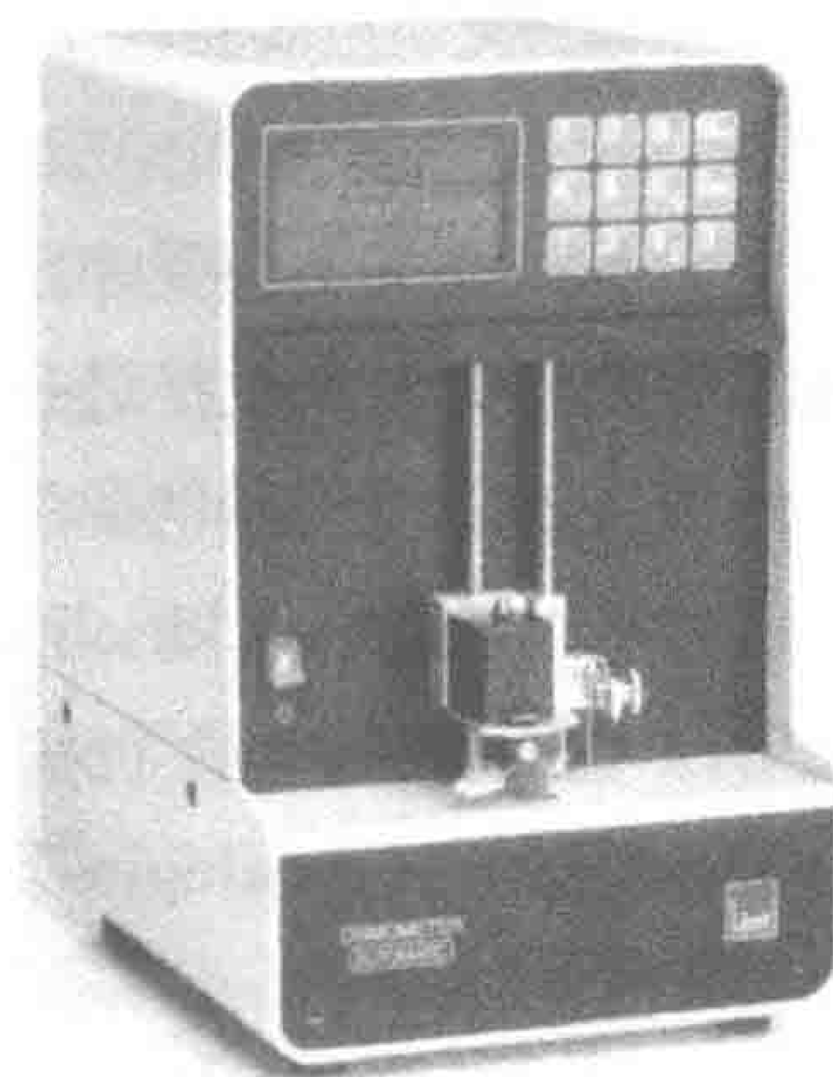


图 8.6　渗透压计。Löser 渗透压计，该型号适合的样品量为 100μL（由 Camlab，Ltd. 提供）

8.2.6　温度

确定细胞培养最适温度有不同的依据：①取材动物的体温；②取材组织通常所处的温度（如皮肤和睾丸组织的温度可能要低于身体其他组织的温度）；③温箱调节温度可能出现的微小差异应在细胞可承受的安全范围之内。因此对于大部分人体细胞和温血动物细胞系，推荐的温度是 37℃，它接近于体温；但为了安全可以再稍低一些，因为高于体温的温度要比低于体温的温度易产生更多的问题。

由于鸟类的体温较高，鸟类细胞维持在 38.5℃可以保持最快的生长，但如果维持在 37℃，虽然细胞生长速度慢一些，其生长状态却更令人满意。

培养中的哺乳动物细胞对低温的耐受范围比较大，能够在 4℃存活几天，能够冻存于−196℃（参见方案 15.1）。但它们不能够耐受比正常温度高出 2℃的高温（39.5℃），在此温度下它们只能存活几个小时；如果处于 40℃及 40℃以上的温度，它们将很快死亡。

必须注意温度稳定在±0.5℃，以保证结果的可重复性。温箱的门不要长时间地敞开，需要放入温箱加温的物品及大容量的液体不要放在靠近培养物的地方。温箱或温室内整个空间的温度应该是一致的（参见 3.2.5 节、4.3 节）；不能够有“冷点”，空气要能够自由地循环，这意味着一开始将培养瓶放入温箱或温室时，不能够大量重叠堆放在一起，要留有空间以利于空气的循环。为了让培养瓶内的气相达到 37℃，培养瓶在放入温箱或温室后必须旋松瓶盖 30min~1h 使气体排出，尤其是在重叠堆放时。显然，如果在 CO_2 温箱中使用可排气的盖子，就没有必要这样做。

变温动物（冷血动物，不能将血温调节在一个狭小的范围）对温度的耐受范围很宽，一般为 15~26℃。为了模拟体内的环境（如对于某种冷水鱼），可能需要一个能够降温的孵育器，如同能够加温的温箱，以保持孵育器的温度低于大气。如果需要，变温动物的细胞可以维持在室温，但实验室中大气温度的变化对细胞生长不利，用低温孵育器最好。

目前出现了一些温度敏感型（ts）突变细胞系，这些细胞系在低于某一温度时有特异性基因的表达，而高于这一温度时则不表达（Wyllie et al.，1992；Varga et al.，2008）。这些突变细胞系促进

了细胞调控方面的研究，但也更强调要将温度控制在一个狭小的范围，因为这两种情况的温差只有2~3℃。培养ts突变细胞通常需要一个既能降温又能加温的孵育器，以弥补温暖的环境温度。

温度除了直接影响细胞的生长，还会影响培养基的pH，因为温度较低时CO_2的溶解性增加，可能还会导致离子强度和缓冲液表观解离常数（pK_a）的改变。在室温的条件下，pH应当比在37℃时下调0.2单位。第一次配制某种培养基时，为了检验pH，最好配制成完全培养基，而后取一些样品放在37℃，以正确的气体压力孵育过夜（见8.2.2节，彩版22b）。


彩版22

8.2.7 黏度

培养基的黏度主要受血清含量的影响，大部分情况下对细胞生长的影响很小。但是当细胞悬液被搅动的时候（如搅拌进行悬浮培养），或细胞被胰酶解离之后，培养基的黏度就显得很重要。这时候如果增加培养基的黏度可以使细胞的损伤降低，要增加黏度可以在培养基中加入羧甲基纤维素（CMC；Sigma-Aldrich）或聚乙烯（PVP；Sigma-Aldrich）（Cherry and Papoutsakis，1990；另见附录Ⅰ）。在低血清、无血清培养及搅拌的生物反应器培养时这点尤其重要（参见21.1节），聚醚F68（Life Technologies）和其他聚合物常被使用（Chun et al.，2012）。

8.2.8 表面张力和成泡性

泡沫的形成有何影响还不太清楚，但蛋白质的变性率可能会因此增加，当泡沫到达培养瓶颈部时，污染的危险性也增加。如果泡沫溢出或泡沫的膜位于培养瓶的盖与瓶口之间，或位于培养皿的盖与底座之间，还将限制气体的扩散。

在搅拌瓶或生物反应器中进行悬浮培养时，若将含有5% CO_2的气体通入含有血清的培养基中，形成泡沫的机会将会上升。加入一种硅酮树脂抗泡沫剂（life technologies）或0.01%~0.1%的聚醚F68，通过降低表面张力有助于抵抗泡沫的形成，也可保护细胞抵抗来自泡沫的剪切力。与生长初期相比，虽然细胞可能对剪切力的敏感性降低（Nienow，2006；Godoy-Silva，2009），但直接向培养瓶充气时，CO_2不能通入培养基中，因为这样可能会产生泡沫，也会从培养瓶扩散出气溶胶。

8.3 平衡盐溶液

平衡盐溶液（BSS）由无机离子组成，可以含有碳酸氢钠，有时还含有葡萄糖。部分常用平衡盐溶液的组分列于表8.2。如果需要还可以在这些平衡盐溶液中加入HEPES（5~20mmol/L），而此时用于维持平衡的NaCl的量就可减少，以保持正确的渗透压。BSS是许多完全培养基的基液，供应商可以提供Hanks盐溶液的Eagle's MEM（Hanks and Wallace，1949），也可提供Earle's盐溶液的Eagle's MEM（Earle et al.，1943），以此说明使用了何种BSS配方来配制培养基；用Hanks盐溶液是以空气作为气相条件，使用密闭的培养瓶，而使用Earle's盐溶液意味着含有较高的碳酸氢盐浓度，适合于5% CO_2的生长条件。

BSS还可用于稀释浓缩的氨基酸、维生素溶液以配制完全培养基，也可作为等渗的漂洗或分

离用培养基。如果含有葡萄糖，还可对培养物进行短暂的培养（不超过4h）。BSS的配方常有修改，如Hanks' BSS有不含葡萄糖或不含酚红的，Dulbeccos PBS（Dulbecco and Vogt，1954）有不含Ca^{2+}、Mg^{2+}的。不含有Ca^{2+}、Mg^{2+}的PBS被称为PBS溶液A，D-PBSA是本书中约定的写法，贯穿始终，以表明Dulbeccos' PBS中缺乏这些二价阳离子。在购买BSS的时候，应当检查一下修改的地方，应当与原作者报道及发表的配方相比较。

选择BSS主要从两个方面考虑：CO_2的压力（参见8.2.2节和表8.1、表8.2）及是否用于组织的分离或单层细胞的分散，若是用于分离消化组织，通常不能含有Ca^{2+}、Mg^{2+}，可使用Moseona（1952）的无钙镁盐溶液（CMF）（Moscona，1952）或D-PBSA（表8.2）。BSS的选择还应考虑溶液是否用于贴壁细胞的悬浮培养。S-MEM是一种以Eagle's Spinner盐溶液为基础配制的培养基，是Eagle(1959)低限量基础培养基（MEM）的变种，它不含有Ca^{2+}以减少细胞的凝聚和粘连（参见表8.3）。

HBSS、EBSS和D-PBS都是与较弱的磷酸盐缓冲液相关的盐溶液，在生理pH范围内磷酸缓冲液并不是最有效的，以Tris作为缓冲系统的BSS在生理pH范围内更有效（Paul，1975），但在使用时细胞有时需要一个适应和（或）选择期。尽管如果大量使用，两者的价格都比较高，但HEPES（10~20mmol/L）还是被广泛使用，它在pH 7.2~7.8是最有效的（参见图8.1），TRICINE则在pH 7.4~8.0最有效。

8.4 完全培养基

“完全培养基”是指已经添加了各种添加物、含有培养基的所有成分、能够满足某种特定细胞生长所需的培养基。通常是用限定成分培养基来配制，一些不稳定成分在临用前加入，如谷氨酰胺和各种补充物，以及血清、生长因子或激素。限定成分培养基的品种繁多，从简单的Eagle's MEM（Eagle，1959），它仅含有必需氨基酸、维生素、无机盐，到复杂的完全培养基，如199培养基（M199）（Morgan et al.，1950）、CMRL1066（Parker et al.，1957）、MB752/1（Waymouth，1959）、RPMI1640（Moore et al.，1967）及F12（Ham，1965）等（表8.3），直至各种无血清培养基（表9.1、表9.2）。必须注意的是，培养基中的氨基酸分为必需氨基酸和非必需氨基酸，这些氨基酸与那些被定义为营养物质的氨基酸是一样的，在体内它们是在肝中合成。复杂的培养基含大量不同的氨基酸，包括非必需氨基酸，以及附加的维生素，还常常添加一些特殊的代谢物（如核苷、三羧酸循环的中间产物、脂类）和矿物质。总的来说，F12的营养成分浓度低（适合于克隆化培养），而Dulbecco改良的Eagle's MEM（DMEM）（Dulbecco and Freeman，1959）营养成分浓度高，适合于高细胞密度、大量繁殖的情况。Barnes和Sato（1980）发明了将F12与DMEM按1∶1混合作为无血清培养基的基液，这一配方融合了F12营养成分多样而DMEM营养成分浓度高的特点，虽然已经使用的这个方案对所有的细胞系不一定是最佳的，但提供了一个经验配方，它可作为一种基础培养基，添加各种不同的特殊物质以满足许多不同类型细胞的需求。

8.4.1 氨基酸

氨基酸被定义为必需或非必需是依据它们在体内可否被合成，而这个概念也被用于培养基，用

于定义在体外是必需或非必需（表 8.4）。必需氨基酸（即体内不能合成的氨基酸）是培养细胞都需求的，这里还要加上胱氨酸和（或）半胱氨酸、精氨酸、谷氨酰胺及酪氨酸，所以“必需”具有了新的含义。此外，不同类型的细胞对氨基酸的需求有差别。其他一些非必需氨基酸也常常要提供，因为有些特殊细胞类型不能合成或有些细胞能够合成但又在培养基中降解了，这些氨基酸可以购得，作为添加物（NEAA）加入培养基，或包含在配方中，如 α-MEM 的配方中就含有（Stanner et al., 1971）。

表 8.4　必需和非必需氨基酸

氨基酸	体内	体外 MEM EE[a]	MEM NEAA[b] 添加物	Ham's F12 完全培养基
丙氨酸	NE	NE	无	有
精氨酸	NE	E	无	有
天冬酰胺	NE	NE	有	有
天冬氨酸	NE	NE	有	有
胱氨酸	NE	E	无	无
半胱氨酸	NE	NE	无	有
异亮氨酸	E	E	无	有
谷氨酸	NE	NE	有	有
谷氨酰胺	NE	E	有	有
甘氨酸	NE	NE	有	有
组氨酸	E	E	无	有
亮氨酸	E	E	无	有
赖氨酸	E	E	无	有
甲硫氨酸	E	E	无	有
苯丙氨酸	E	E	无	有
脯氨酸	NE	NE	有	有
丝氨酸	NE	NE	有	有
苏氨酸	E	E	无	有
色氨酸	E	E	无	有
酪氨酸	NE	E	无	有
缬氨酸	E	E	无	有

注：E. 必需氨基酸；NE. 非必需氨基酸

a 在 Eagle's MEM 中定义为必需氨基酸

b 非必需氨基酸作为一种添加物存在于 α-MEM，可从 Sigma-Aldrich、Life Technologies 和其他公司购得

氨基酸的浓度通常限制着细胞生长所能达到的最大浓度，这种平衡可能会影响细胞存活和生长的比例。虽然有些细胞系能利用谷氨酸盐，但大多数细胞需要谷氨酰胺，有证据表明谷氨酰胺主要作为能源和碳源被培养中的细胞所利用（Butler and Christie，1994，另见 2.6 节）。谷氨酰胺在培养基中不稳定，37℃时它的半衰期是 3~5 天，它产生的氨是有毒性的（Hassell et al.，1991）。有一种替代产品 Glutamax（Life Technologies）是一种丙氨酰基谷氨酰胺二肽，它稳定并具有二肽酶的生物活性。

8.4.2　维生素

Eagle's MEM 仅含有水溶性维生素（B 族维生素、胆碱类、叶酸、肌醇、烟碱，但不包括生物素，表 8.3），其他维生素大概可由血清提供。大部分成分复杂的培养基都含有生物素，包括无血清培养基。M199、CMRL1066（来源于 M199）及 RPMI1640 都含有 *p*-氨苯甲酸（PABA）。虽

然LHC-9含有维生素A，MCDB110含有维生素E，但只有M199包含了所有的脂溶性维生素（A、D、E、K）（表9.1）。无血清培养基中某些维生素（如胆碱和烟碱）的浓度有所增加。维生素的加入量是有限的，例如，叶酸在浓缩的储存液中会产生沉淀，通常认为这一极限值决定了细胞死亡与生长比率的降低程度，而不是最大细胞密度。与某些氨基酸一样，维生素的需求量是凭经验的，通常与某个细胞系建系过程中最初使用的培养基有关。例如，Fisher's 培养基含有高浓度的叶酸，这是因为L5178Y对叶酸的依赖性，在这种培养基的发展过程中，叶酸就被沿用下来（Fisher and Sarrorelli，1964）。

8.4.3 盐类

盐类主要包括Na^+、K^+、Mg^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}、PO_4^{3-}及HCO_3^-，它们是维持培养基渗透压平衡的主要化合物。大部分培养基的盐浓度是参照Earle's BSS（碳酸盐含量高，用于5% CO_2的气体环境），或Hanks' BSS（碳酸盐含量低，适用于空气环境）。二价阳离子，特别是Ca^{2+}是某些细胞黏着分子所需求的，如钙黏着蛋白（Yamada and Geiger，1997）。Ca^{2+}在信号转导中还起到中介的作用（Alberts et al.，2014a，2014b），培养基中Ca^{2+}的浓度将影响细胞是否能增殖或分化（Yuspa et al.，1981；Boyce and Ham，1983）（参见19.7.2节、25.2.1节）。Na^+、K^+和Cl^-可调节膜电位，而SO_4^{2-}、PO_4^{3-}及HCO_3^-是基质所需要的阴离子，同时也是形成大分子的养分前体及细胞内电荷的调节者。

在悬浮培养时，为了减少细胞的聚集和附着，要减少钙离子（表8.2、表8.3）。碳酸氢钠的浓度取决于气相中CO_2的浓度（参见8.2.2节），碳酸氢钠除了具有缓冲能力以外，还有显著的营养作用。

8.4.4 葡萄糖

大部分培养基都含有葡萄糖作为能量的来源，它的主要代谢途径是通过无氧酵解产生丙酮酸（Alberts et al.，2014a，2014b），丙酮酸可能再转变为乳酸盐和乙酰乙酸，然后进入柠檬酸循环被氧化形成CO_2和水。培养基中乳酸的堆积在培养胚胎及转化细胞时尤为明显，这提示柠檬酸循环不能像在体内一样完全进行。

8.4.5 有机补充物

成分复杂的培养基还含有许多其他化合物，包括蛋白质、多肽、核苷、柠檬酸循环的中间产物、丙酮酸及脂类等。已发现当培养基中的血清浓度减少时，这些成分都是必需的。即使在使用血清的情况下，这些成分也可帮助细胞的克隆化培养及维持某些特殊细胞系的生长。

8.4.6 激素和生长因子

激素和生长因子在大多数常规培养基的配方中都没有注明，但在无血清培养基中经常要加入它们（参见8.5.2节、8.5.3节、9.4.4节、9.4.5节）。

8.4.7 抗生素

最初在培养基中使用抗生素，是为了减少污染的机会。然而由于使用了层流洁净台（最初的名称，现在称生物安全柜，BSC）及采用严格的无菌操作技术，已无需使用抗生素。事实上使用抗生素有许多缺点。

（1）促进抗药性有机体的生长。

（2）掩盖低水平、隐蔽性的污染，这时如果不用抗生素，或培养条件改变，或出现了抗药菌株，污染就会完全暴露。

（3）掩盖了支原体感染。

（4）产生了抗代谢效应，这种效应能够与哺乳动物细胞产生交叉反应。

（5）使无菌操作水平下降。

以上种种原因都警告我们在进行常规培养时，不要使用抗生素。抗生素的应用仅限于原代培养或大规模、集约化、需要使用价格昂贵的耗材的实验。如果有必要使用抗生素时，也应尽快停用。假如要长时间使用，应将培养物同时培养于不含抗生素的培养基中（参见12.5.7节），作为一种质控检测的措施。

用于组织培养的许多抗生素对于控制细菌污染有一定的效果（表8.5），然而有许多菌株可产生抗药性，不论是自然产生还是选择产生，所以抗生素所能控制的永远不是绝对的。真菌和酵母菌的污染很难用抗生素控制，也许可以检验出，但难以排除（参见14.5.1节）。

表8.5 用于组织培养的抗生素

抗生素	浓度（μg/mL）（其他规定除外）		作用对象
	工作浓度	细胞毒性浓度	
两性霉素B（节丝菌素）	2.5	30	真菌，酵母菌
氨苄青霉素	2.5		细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性
环丙沙星	100		支原体；细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性
红霉素	50	300	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性；支原体
庆大霉素	50	>300	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性；支原体
卡那霉素	100	10mg/mL	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性；支原体
MRA（MP Biomedicals）	0.5		支原体
新霉素	50	3 000	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性
制霉菌素	50		真菌，酵母菌
青霉素-G	100U/mL	10 000U/mL	细菌，革兰氏阳性
多黏霉素B	50	1mg/mL	细菌，革兰氏阴性
硫酸链霉素	100	20mg/mL	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性
四环素	10	35	细菌，革兰氏阳性和革兰氏阴性
泰乐霉素	10	300	支原体

资料来源：仿Paul（1975）和Sigma-Aldrich，抗生素选择（另见表14.3）

8.5 血　　清

血清含有生长因子可促进细胞的繁殖，含有附着因子可促进细胞的贴壁，同时还具有抗胰酶活性。血清同时也是矿物质、脂类及激素的来源，这些物质可结合于血清的蛋白质中（表8.6）。

表 8.6　血清的成分

成分	浓度范围[a]
蛋白质和多肽	40~80mg/mL
白蛋白	20~50mg/mL
胎球蛋白[b]	10~20mg/mL
纤连蛋白	1~10μg/mL
球蛋白	1~15mg/mL
蛋白酶抑制剂：α_1-抗胰蛋白，α_2-巨球蛋白	0.5~2.5mg/mL
转铁蛋白	2~4mg/mL
生长因子	
EGF，PDGF，IGF-Ⅰ和-Ⅱ，FGF，IL-1，IL-6	1~100ng/mL
氨基酸	0.01~1.0μmol/L
脂类	2~10mg/mL
胆固醇	10μmol/L
脂肪酸	0.1~1.0μmol/L
亚油酸	0.01~0.1μmol/L
磷脂	0.7~3.0mg/mL
碳水化合物	1.0~2.0mg/mL
葡萄糖	0.6~1.2mg/mL
氨基己糖[c]	6~1.2mg/mL
乳酸[d]	0.5~2.0mg/mL
丙酮酸	2~10μg/mL
聚胺	
腐胺，精胺	0.1~1.0μmol/L
尿素	170~300μg/mL
无机物	0.14~0.16mol/L
钙	4~7mmol/L
氯	100μmol/L
铁	10~50μmol/L
钾	5~15mmol/L
磷酸盐	2~5mmol/L
硒	0.01μmol/L
钠	135~155mmol/L
锌	0.1~1.0μmol/L
激素	0.1~200nmol/L
氢化可的松	10~200nmol/L
胰岛素	1~100ng/mL
三碘甲状腺氨酸	20nmol/L
甲状腺素	100nmol/L
维生素	10~10μg/mL
维生素 A	10~100ng/mL
叶酸	5~20ng/mL

a 浓度范围只是概算的，仅仅旨在指出量值序列。资料来自 Evans 和 Sanford（1978），Cartwright 和 Shah（1994）

b 只存在于胎牛血清

c 人血清中含量最高

d 胎牛血清中含量最高

最常用于组织培养的血清是小牛血清、胎牛血清、成年马血清及人血清，小牛血清（CS）和胎牛血清（FBS）应用最广泛，尤其是胎牛血清对要求高的细胞系和克隆化培养效果很好。人血清有时要用于人细胞系的培养，但使用时要检测病毒，如HIV、乙肝病毒。在进行某些研究工作时，使用马血清比牛血清更好，因为马血清可以来源于圈养的马，批间差较小。由于多胺氧化酶的水平低，马血清也不太可能促使多胺的代谢，而多胺是某些细胞的有丝分裂原（Hyvonen et al.，1988；Kaminska et al.，1990）。

8.5.1 蛋白质

虽然蛋白质是血清的主要成分，但许多蛋白质的功能在离体情况下所剩无几，有几种有关的蛋白质可能是需要的，如携带矿物质、脂肪酸、激素的蛋白质。已知可满足这些需求的蛋白质有：白蛋白（Iscove and Melchers，1978；Barnes and Sato，1980），作为脂类、矿物质的一种携带者，它可能很重要（Tozer and Pirt，1964）；丝氨酸蛋白酶抑制剂，如α_1-抗胰蛋白酶；球蛋白，如α_2-巨球蛋白，它是胰蛋白酶的抑制剂（de Vonne and Mouray，1978）；纤连蛋白（冷不溶性球蛋白），它可促进细胞贴壁（Hynes，1992；Yamada and Geiger，1997），尽管不如细胞分泌的纤连蛋白有效。此外，胎儿血清中的胎球蛋白可增进细胞的贴附（Nie，1992；Sakwe et al.，2010）；转铁蛋白可结合铁离子（Guibert and Iscove，1976），使其毒性减小而具有生物可利用性。其他一些未知的蛋白质对于细胞的贴附和生长可能也是必需的。

血清蛋白还可增加培养基的成泡性，在吹打和搅拌时可减少切力，可能还会增加培养基的缓冲力。

8.5.2 生长因子

自然凝集得到的血清比用物理方法（如离心）去除细胞的血浆刺激细胞增殖的效果更好。这种刺激效果的增加是由于生长因子的释放，特别是血小板生长因子（PDGF），它是凝集过程中由血小板产生的。PDGF（Antoniades et al.，1979；Heldin et al.，1979）是具有有丝分裂原活性的多肽家族的一员，可能是血清中的主要生长因子。PDGF刺激成纤维细胞和神经胶质细胞的生长，而其他血小板生成因子，如TGF-β，可能会抑制其生长或者促进上皮类细胞的分化（Lechner et al.，1981）。

其他生长因子（参见表9.4），如成纤维细胞生长因子（FGF）（Gospodarowicz，1974）、表皮细胞生长因子（EGF）（Cohen，1962；Gospodarowicz et al.，1978）、内皮细胞生长因子如血管内皮细胞生长因子（VEGF）和血管生成素（Folkman et al.，1979；Maciag et al.，1979；Folkman and d'Amore，1996；Hu et al.，1997；Joukov et al.，1997）、类胰岛素生长因子IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ（le Roith and Raizada，1989）都已从完整组织或培养过细胞的培养基中分离得到，这些生长因子各自具有不同程度的特异性（Hollenberg and Cuatrecasas，1973），它们可能存在于血清中，但含量非常少（Gospodarowicz and Moran，1974）。许多的这些生长因子都以重组蛋白的形式实现了商业化（参见补充材料中的附录Ⅲ），有些还可以作为长期的模拟物（Sigma-Aldrich）来增加有丝

分裂原的活性和稳定性。

8.5.3　激素

胰岛素可促进细胞对葡萄糖（Karim et al.，2012）和氨基酸（Dimitriadis et al.，2011）的摄取，这可能是由于其本身具备有丝分裂原的作用，从而产生这一特性或增加了 IGF-Ⅰ受体的活性。IGF-Ⅰ和 IGF-Ⅱ可结合于胰岛素受体，但它们也有自己的特异性受体，而胰岛素与这些受体的亲和力很低。IGF-Ⅱ也可刺激葡萄糖的摄取（Sinha et al.，1990）。血清中含有生长激素，特别是胎儿期的血清，生长激素与促生长因子（IGF）结合可能具有有丝分裂原的效果。血清中还有含量不等的氢化可的松，特别是在胎牛血清中，它可促进细胞的附着（Ballard and Yomkins，1969；Fredin et al.，1979）和增殖（Guner et al.，1977；McLean et al.，1986），但在特定的条件下（如高细胞密度）可能使细胞静止（Freshney et al.，1980），它还能够诱导细胞的分化（Moscona and Piddington，1996；Ballard，1979；McLean et al.，1986；Speirs et al.，1991；McComick et al.，1995；McComick and Freshney，2000）。

8.5.4　营养物及代谢物

血清可能还含有氨基酸、葡萄糖、酮酸（酮类）、核苷及其他一些营养物质和中间代谢物，对于成分简单的培养基，这些物质可能很重要；而对于那些成分复杂的培养基，特别是含有高浓度氨基酸和其他补充物的培养基，这些物质就不那么重要了。

8.5.5　脂类

血清中含少量亚油酸、油酸、乙醇胺和磷酸乙醇胺，它们通常结合于蛋白质如白蛋白上。

8.5.6　矿物质

血清替代实验（Ham and McKeehan，1978）提示微量元素及铁、铜、锌可能都结合于血清蛋白，这种蛋白质可能是白蛋白。McKeehan 等（1976）已证实血清中的硒是细胞培养需求的，它可能作为 GSH 合成酶的辅助因子，有助于消除自由基的毒性，绝大多数无血清培养基的配方中都含硒（参见 9.4 节、9.5 节）。

8.5.7　抑制物

血清中可能也含有抑制细胞增殖的物质（Harrington and Godman，1980；Liu et al.，1992；Varga Weisz and Barnes，1993），其中一些可能是血清制备过程的产物（例如，来源于过滤之前污染的细菌毒素或抗体，它能够与培养细胞的表面结合位点产生交叉反应），而另一些是生理上

的非生长调节因子，如 TGF-β（Massague et al.，1992）。热灭活可去除血清中的一些物质，减少免疫球蛋白的细胞毒性而不破坏多肽生长因子，但也可能去除一些较不稳定的成分，并不总是比未处理的血清安全。

8.6 培养基和血清的选择

表 8.3 所列的 12 种培养基可满足各种特殊细胞系或条件细胞系的要求。许多培养基是根据 L929 小鼠成纤维细胞或 HeLa 宫颈癌细胞的需求而设计的，Ham's F12 是为中国仓鼠卵巢细胞（CHO）设计的，现在所有这些培养基都已被广泛应用，具有标准的配方。DMEM、MEM 和 RPMI1640 是应用最广泛的，大约占销售量的 70%（Arora，2013）。其他品种的销售量都没有超过总量的 5%，尽管 DMEM 与 F12 混合培养基的销售量（或）已超过接近 7%，但大部分还在 2%~3%。

Eagle's 低限量必需培养基（MEM）是由 Eagle's 基础培养基（BME）发展而来的，其中增加了组分的范围及浓度。多年来 Eagle's MEM 已成为所有培养基中最常使用的一种，Dulbecco 改良的 BEM（DMEM）培养基是为小鼠成纤维细胞设计的，小鼠成纤维细胞常用于细胞转化及病毒增殖的研究。DMEM 的氨基酸浓度是 MEM 的 2 倍，维生素的浓度是 MEM 的 4 倍，采用双倍的 HCO_3^- 和 CO_2 浓度将起到更好的缓冲作用。MEM（Stanners et al.，1971）含有附加的氨基酸、维生素，以及核苷和脂肪酸。它可广泛应用于各种细胞类型，包括造血细胞。Ham's F12 是为在低血清浓度下克隆 CHO 细胞而设计的，现在也已得到广泛的应用，特别是用于克隆形成率的分析（参见方案 23.10、方案 24.3）及原代培养（参见方案 11.7~方案 11.9），常常与 DMEM 联合使用。

CMRL1066、M199 和 Waymouth's 培养基的研制是为了以无血清培养基培养 L929 细胞，它们可单独使用，也可与其他培养基（如 DMEM 或 F12）混合使用以满足各种附加条件。RPMI1640 及 Fischer's 培养基是专为淋巴样细胞培养而设计的，Fischer's 则专用于 L5178Y 淋巴细胞瘤，它具有高叶酸需求。RPMI1640 已经得到十分广泛的应用，尽管它是为悬浮培养而设计的，缺乏 Ca^{2+}，但也常用于贴壁细胞。L15 培养基的设计特别针对在缺乏 HCO_3^- 和 CO_2 的情况下如何保证缓冲能力，因此它常用于转染实验及原代培养。由于使用了 HEPES，价格降低了，但 HCO_3^- 和 CO_2 对于维持细胞最佳生长状态常常是必需的，而不仅只是缓冲作用的需要。

对于某种类型的细胞，选择适宜的培养基主要参考这种细胞系最初建系所发表的文章或类似细胞系的培养，也可从细胞的来源处获得。细胞库可以提供常用细胞系所用培养基的信息，从它们的网站可以获得数据表（参见表 19.5 和补充材料中的附录Ⅳ，另见表 8.7）。除此之外，还可根据经验或如同选择血清那样通过几种培养基的选择测试来挑选培养基（参见 8.6.2 节）。

许多连续细胞系（如 HeLa、L929、BHK21），人、啮齿类动物细胞的原代培养物，鸟类成纤维细胞，以及由此而来的细胞系都可培养在相对简单的培养基中，如添加血清的 Eagle's MEM。比较复杂的培养基一般用于需要表达特殊功能的细胞培养（参见 19.7 节）或当细胞处于低密度（$<1\times10^3$ 个/mL）时的传代培养，如克隆化培养（参见 16.2 节）。通常情况下，对培养条件要求高的细胞在需要使用复杂培养基时也需要使用胎牛血清而不能使用小牛血清或马血清，除非使用特殊配方的无血清培养基。

表8.7　选择合适的培养基

细胞或细胞系	培养基	血清
3T3 细胞	MEM，DMEM	CS
鸡胚成纤维细胞	Eagle's MEM	CS
中国仓鼠卵巢细胞（CHO）	Eagle's MEM，Ham's F12	CS
软骨细胞	Ham's F12	FB
连续细胞系	Eagle's MEM，DMEM	CS
内皮细胞	DMEM，M199，MEM	CS
成纤维细胞	Eagle's MEM	CS
神经胶质细胞	MEM，DMEM/F12	FB
神经胶质瘤	MEM，DMEM/F12	FB
HeLa 细胞	Eagle's MEM	CS
造血细胞	RPMI1640，α-MEM	FB
人二倍体成纤维细胞	Eagle's MEM	CS
人白血病细胞	RPMI1640	FB
人肿瘤细胞	DMEM/F12，L15，RPMI1640	FB
角质形成细胞	MEM	FB
L 细胞（L929，LS）	Eagle's MEM	CS
成淋巴细胞系（人）	RPMI1640	FB
乳腺上皮细胞	DMEM/F12，RPMI1640	FB
MDCK 狗肾上皮细胞	DMEM，DMEM/F12	FB
黑素细胞	M199	FB
黑色素瘤	DMEM，MEM，DMEM/F12	FB
小鼠胚胎成纤维细胞	Eagle's MEM	CS
小鼠白血病细胞	Fisher's，RPMI1640	FB，HoS
小鼠红白血病细胞	DMEM/F12，RPMI1640	FB，HoS
小鼠骨髓瘤	DMEM，RPMI1640	FB
小鼠成神经细胞瘤	DMEM，DMEM/F12	FB
神经元	DMEM	FB
NRK 大鼠肾成纤维细胞	MEM，DMEM	CS
大鼠最小变异肝癌细胞（HTC，MDH）	Swim's S77，DMEM/F12	FB
骨骼肌细胞	DMEM，F12	FB，HoS
叙利亚仓鼠卵巢细胞（如 BHK21）	MEM，GMEM，DMEM	CS

注：见表 9.5 无血清培养基的选择；CS=小牛血清；FB=胎牛血清；HoS=马血清。SF12，为 Ham's F12 加上 Eagle's 所含的必需氨基酸，非必需氨基酸与 DMEM 相同，可用 100×储存液（参见附录Ⅱ）。有关培养基选择的进一步说明见 Barnes 等（1984a，1984b，1984c，1984d）和 Mather（1998）

表 8.7（另见 Mather，1998）列出了部分细胞类型及与其相适宜的培养基，可供参考。如果提供的信息不合适，可用各种购买的培养基花大约两周的时间做一个简单的细胞生长实验和微孔板接种实验（参见方案 23.8）以选择适当的培养基。如果要分析克隆形成率（参见方案 23.10）或测定特殊功能的表达，就要进一步缩小选择的范围。你可能会惊奇地发现你的最佳培养条件与文章所报道的不同，因为制备过程或供应商的不同，要再现另一个实验室的培养条件是很困难的，

差别来自试剂、水及不同批号血清之间的差异。当血清的需求量减少、试剂的纯度增加时，培养基的稳定性才有望得到提高。

最后，可能还要从价格的角度考虑选择某种培养基或血清。可向供应商（参见补充材料中的附录III）购买可高温高压灭菌的培养基，用粉剂配制培养基也很简单，并且适合于许多无限细胞株。培养基中可能需要添加谷氨酰胺，大部分细胞还需要添加血清。当细胞的产量不重要时，计算血清的价格是以培养基的体积为基数；如果目的是生产大量的细胞，则计算血清的价格就要以每毫升的细胞量为基数。例如，血清 A 可培养 10^6 个/mL，而同样价格的血清 B 可培养 2×10^6 个/mL，血清 B 就比血清 A 便宜了一半；如果是为了生产某种物质或为了获得某种特殊的功能，就是以目的产物为计算的基数。

如果必须使用胎牛血清，可以尝试与小牛血清混合使用，这可能减少价格较高的胎牛血清的使用浓度。如果能够完全不用血清或降低血清的使用浓度，就用无血清培养基（参见 9.4 节）。

8.6.1 血清批次预约

血清批次间的差别是不可避免的，这种差异来源于不同的制备方法和除菌方法、动物的年龄差别及血清的储存条件等，而且与取血动物的来源关系密切，不同种的动物、不同的牧场、不同的气候条件及其他环境因素都可影响血清的质量。因此选择一批血清就要尽可能长期使用它，在需要更换时，要尽量保持与原有的一批相似，这些都很重要。

血清的标准化是困难的，因为批次很多，每一批最多只能在–20℃储存 6 个月至 1 年。可以从许多供应商处得到不同批次的血清进行测试，根据你的目的选择最适合的血清，大多数供应商可以预留某批血清，直至客户选择出最佳的批次（一般不超过 3 周）。一旦选择出适宜的批次，供应商就要很快地按要求提供适宜的量，至少可用一年以上。还应告知其他供应商，以便他们将退回的批次放回仓库。

8.6.2 血清的测试

供应商应保证血清的一般质量，但硬性的质控标准通常是以诸多连续细胞系中的某一种细胞来建立的。如果您的要求比较特殊，就需要您自己进行血清的测试，测试血清一般有 4 个参数，具体如下。

接种率 这是一项很有说服力的参数，克隆化培养时，细胞呈低密度状态，因此是最敏感的。以每毫升 10~100 个细胞（2~20 个细胞/cm^2）的密度接种细胞，10~14 天后染色观察及统计集落（参见方案 23.10）。观察接种率（存活率）的差别、集落大小（细胞的增殖速度）的差别。每种血清应测试 2%~20%的不同浓度，这样可以了解一种血清在低浓度时是否具有同等的效果，以节约经费并预算一批血清的使用时间，同时还可以了解在高浓度情况下是否具有细胞毒性。

生长曲线 可根据细胞在每批血清中的培养状况绘制出一条生长曲线（参见方案 23.7~方案 23.9），从中可确定停滞期、倍增时间及饱和密度（达到曲线平顶期的细胞密度）。停滞期长说明培养物需要适应这种血清；倍增时间短有利于很快地获得大量细胞；而饱和密度高表明在血清用

量等同的情况下可获得更多的细胞，更经济实惠。生长曲线测定是一件费力的工作，可以利用多孔板和发色团终端，如 MTT 分析法来简化这项工作（参见 24.3.5 节），还可选择通过图像分析系统（Incucyte，Chip-Man；见 23.9.3 节）进行连续原位监视来快速分析生长曲线，无需取样和计数。

细胞培养特征的保留 显然，在新的血清中培养的细胞必须要能满足您的需求。例如，它们是否可作为某种病毒的宿主细胞、是否能够产生一定的细胞产物、是否具有某种分化的特征，或者是否保持对某种药物的敏感性等。因此，批次间的比较可能需要实验室特殊的功能分析。

无菌程度 信誉较好的供应商所提供的血清已经过测试，没有微生物污染。但支原体污染有可能逃过质量控制，应对样品进行支原体检测（参见 14.3.2 节~14.3.6 节），所选择的批次在最终接受之前都应该进行常规检测。

8.6.3 热灭活

血清的灭活就是将血清置于 56℃作用 30min，然后可将它们分装储存于–20℃。最初，加热是免疫分析时用于灭活补体的，当时并不知道它是否还具有其他作用。用于培养的血清通常是经过灭活的，但这是以往公认的操作程序，并没有确凿的证据说明这样做是有益的。虽然灭活有可能降低支原体的滴度，但能够消除支原体的论点还不能算是成立的。

8.7 其他添加物

除了血清之外，组织提取物和消化物也常作为组织培养基的添加物（另见 9.4.2 节）。

8.7.1 氨基酸水解物

这类添加物多数源于微生物培养基。细菌胨、胰蛋白、乳白蛋白水解物（BD biosciences）是牛心肌或乳白蛋白的消化物，主要含有许多氨基酸或小肽，细菌胨和胰蛋白可能还含有核苷及其他热稳定组织成分，如脂肪酸和碳水化合物等。这些培养基可进行高温高压灭菌，简单易行（参见 10.5.1 节）。

8.7.2 胚胎浸出液

胚胎浸出液是将 10 天的鸡胚匀浆后离心而获得的粗提物（参见附录 I ）。胚胎浸出液很早就作为血浆凝块的一种成分而被使用，它可促进细胞从外植培养物中迁移出来（参见 2.7.1 节、11.3.1 节），目前在器官培养中还继续使用（参见 20.2 节）。制备时至少要冻融两次才能保证不含有来自胚胎的活细胞。

8.7.3 适应性培养基

Puck 和 Marcus（1955）发现饲养层细胞的生长有助于低密度培养物的存活（参见 16.2.3 节）。

在他们的案例中，这种效果来源于产生了可溶性的因子，因为克隆与饲养层细胞是分开的。而通常情况下克隆与饲养层细胞是分不开的，这种效应可能是两个方面因素的结合，即适宜的底层基质和适宜的培养基，前者来自饲养层细胞分泌的细胞外基质组分，后者是由于饲养层细胞可释放代谢物及生长因子至培养基中（Takahashi and Okada，1970）。Hauschka 和 Konigsberg（1966）发现，对于成肌细胞的生长、分化所必需的适应性培养基是培养基中含有饲养层细胞所分泌的胶原。培养胚胎成纤维细胞或其他一些细胞也使用了饲养层细胞及适应性培养基，这是培养“困难细胞”的有效方法（例如，见 Stampfer et al.，1980）。尽管如此，适应性培养基中还要加入未知的组分，只有在活性物质被确定之后才可不加入。

8.8 储　　存

培养基的不同组成将产生不同的化学稳定性，因此储存条件将有所改变（参见第 10.6.4 节），有些组分是光敏感的，会产生毒性副产物，要避光保存，尤其要避开荧光（Zigler et al.，1985）。

参考文献

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds.) (2014a). *Essential cell biology*. New York: Garland Science, pp. 422–430.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds.) (2014b). *Essential cell biology*. New York: Garland Science, pp. 548–549.

Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD (1979). Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1809.

Arora M (2013). Cell culture media: A review. *Mater. Methods* **3**:175 (http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175).

Balin AK, Goodman BP, Rasmussen H, Cristofalo VJ (1976). The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells. *J. Cell Physiol.* **89**:235–250.

Ballard PL (1979). Glucocorticoids and differentiation. *Glucocorticoid Horm. Action* **12**:439–517.

Ballard PL, Tomkins GM (1969). Dexamethasone and cell adhesion. *Nature* **244**:344–345.

Barnes D, Sato G (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **102**:255–270.

Bath C, Yang S, Muttuvelu D, Fink T, Emmersen J, Vorum H, Hjortdal J, Zachar V (2013). Hypoxia is a key regulator of limbal epithelial stem cell growth and differentiation. *Stem Cell Res.* **10**:349–360.

Baumann RP, Penketh PG, Seow HA, Shyam K, Sartorelli AC (2008). Generation of oxygen deficiency in cell culture using a two-enzyme system to evaluate agents targeting hypoxic tumor cells. *Radiat. Res.* **170**(5):651–660.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008). The impact of O2 availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**:967–975.

Boyce ST, Ham RG (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**:33s–40s.

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J (2007). Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med* **85**:1301–1307.

Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell. Metabol.* **1**:409–414.

Buck LD, Inman SW, Rusyn I, Griffith LG (2014). Co-regulation of primary mouse hepatocyte viability and function by oxygen and matrix. *Biotechnol Bioeng.* **111**(5):1018–1027.

Butler M, Christie A (1994). Adaptation of mammalian cells to non-ammoniagenic media. *Cytotechnology* **15**:87–94.

Catt J, Henman M (2000). Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum. Reprod.* **15**(Suppl. 2):199–206.

Chen G, Palmer AF (2008). Hemoglobin-based oxygen carrier and convection enhanced oxygen transport in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**:1603–1612.

Cherry RS, Papoutsakis ET (1990). Understanding and controlling fluid-mechanical injury of animal cells in bioreactors. In SpierRE, GriffithsJB (eds.), *Animal cell biotechnology*, Vol. **4**. London: Academic Press, pp. 71–121.

Chun BH, Lee YK, Chung N (2012). Poly-γ-glutamic acid enhances the growth and viability of Chinese hamster ovary cells in serum-free medium. *Biotechnol. Lett.* **34**:1807–1810.

Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**:1555–1562.

Cooper P, Burt A, Wilson JN (1958). Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. *Nature* **182**:1509–1509.

De Ridder L, Mareel M (1978). Morphology and I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**:189–194.

De Vonne TL, Mouray H (1978). Human α_2-macroglobulin and its antitrypsin and antithrombin activities in serum and plasma. *Clin. Chim. Acta* **90**:83–85.

Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93**(Suppl. 1):S52–S59.

Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM (2013). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J. Cell Physiol.* **223**:27–35.

Dulbecco R, Freeman G (1959). Plaque formation by the polyoma

virus. *Virology* **8**:396–397.

Dulbecco R, Vogt M (1954). Plaque formation and isolation of pure cell lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **199**:167–182.

Eagle H (1955). The specific amino acid requirements of mammalian cells (stain L) in tissue culture. *J. Biol. Chem.* **214**:839.

Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**:432.

Eagle H (1973). The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell Physiol.* **82**:1–8.

Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E (1943). Production of malignancy *in vitro*; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**:165–212.

Eisinger M, Lee JS, Hefton JM, Darzykiewicz A, Chiao JW, Deharven E (1979). Human epidermal cell cultures—growth and differentiation in the absence of dermal components or W supplements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5340.

Fischer GA, Sartorelli AC (1964). Development, maintenance and assay of drug resistance. *Methods Med. Res.* **10**:247.

Fleischaker RJ, Sinskey AJ (1981). Oxygen demand and supply in cell culture. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**:193−197.

Folkman J, D'Amore PA (1996). Blood vessel formation: What is its molecular basis? Minireview. *Cell* **87**:1153–1155.

Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR (1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5217–5221.

Forsyth NR, Musio A, Vezzoni P, Simpson A, Noble BS, McWhir J (2006). Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Clon. Stem Cell* **8**:16–23.

Fredin BL, Seiffert S. C, Gelehrter TD (1979). Dexamethasone-induced adhesion in hepatoma cells: The role of plasminogen activator. *Nature* **277**:312–313.

Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D (1980). Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. *Br. J. Cancer* **41**:857–866.

Godoy-Silva R, Chalmers JJ, Casnocha SA, Bass LA, Ma N (2009). Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng*, **103**(6):1103−1117.

Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966). Hydrogen ion buffers and biological research. *Biochemistry* **5**:467–477.

Gospodarowicz D (1974). Localization of fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**:123–127.

Gospodarowicz D, Moran J (1974). Growth factors in mammalian cell cultures. *Annu. Rev. Biochem.* **45**:531–558.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H, Zetter BR (1978). Factors involved in the modulation of cell proliferation *in vivo* and *in vitro*: The role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro* **14**:85–118.

Guilbert LI, Iscove NN (1976). Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* **263**:594–595.

Guner M, Freshney RI, Morgan D, Freshney MG, Thomas DGT, Graham DI (1977). Effects of dexamethasone and betamethasone on *in vitro* cultures from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **35**:439–447.

Ham RG (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**:288.

Ham RG, McKeehan WL (1978). Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro* **14**:11–22.

Hanks JH, Wallace RE (1949). Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Exp. Biol. Med.* **71**:196.

Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM (2013). Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *Sci. World J.* **2013**:632972 (article no.).

Harrington WN, Godman GC (1980). A selective inhibitor of cell proliferation from normal serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biol. Sci.* **77**:423–427.

Hassell T, Gleave S, Butler M (1991). Growth inhibition in cell culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30**:30–41.

Hauschka SD, Konigsberg IR (1966). The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**:119–126.

Heldin CH, Westermark B, Wasteson A (1979). Platelet-derived growth factor: Purification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:3722–3726.

Hollenberg MD, Cuatrecasas P (1973). Epidermal growth factor: Receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:2964–2968.

Hu G-F, Riordan JF, Vallee BL (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:204–209.

Hynes RO (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**:11–25.

Hyvonen T, Alakuijala L, Andersson L, Khomutov AR, Khomutov RM, Eloranta TO (1988). 1-Amino-oxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis. *J. Biol. Chem.* **263**:1138–1144.

Iscove N, Melchers F (1978). Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **147**:923–933.

Ishikawa Y, Ito T (1988). Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur. J. Haematol*, **40**:126−129.

Itagaki A, Kimura G (1974). TES and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies: Problems of carbon dioxide requirements. *Exp. Cell Res.* **83**:351–360.

Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell Physiol.* **173**:211–215.

Kaminska B, Kaczmarek L, Grzelakowska-Sztabert B (1990). The regulation of G_0–S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. *Exp. Cell Res.* **191**:239–245.

Karim S, Adams DH, Lalor PF (2012). Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J. Gastroenterol.* **18**:6771−6781.

Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G (2008). HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* **33** (11):526 – 534.

Le Roith D, Raizada MK (eds.) (1989). *Molecular and cellular biology of insulin-like growth factors and their receptors*. New York: Plenum.

Lechner JF, Haugen A, Autrup H, McClendon IA, Trump BF, Harris CC (1981). Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res.* **41**:2294–2304.

Leibovitz A (1963). The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.* **78**:173–183.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* **141**:872−883.

Liu L, Delbe J, Blat C, Zapf J, Harel L (1992). Insulin like growth factor binding protein (IGFBP-3), an inhibitor of serum growth factors other than IGF-I and -II. *J. Cell Physiol.* **153**:15–21.

Ma T, Grayson WL, Fröhlich M, Vunjak-Novakovic G (2009), Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Progress* **25**:32–42.

Maciag T, Cerondolo J, Ilsley S, Kelley PR, Forand R (1979). Endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus—identification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5674–5678.

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell.* **40**(2):294–309.

Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell. Metabol.* **1**:393–399.

Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A (1992). Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv.* **12**:81–103.

Mather JP (1998). Making informed choices: Medium, serum, and serum-free medium; how to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create. *Methods Cell Biol.* **57**:19–30.

McCormick C, Freshney RI (2000). Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **82**:881–890.

McCormick C, Freshney RI, Speirs V (1995). Activity of interferon alpha, interleukin 6 and insulin in the regulation of differentiation in A549 alveolar carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **71**:232–239.

McKeehan WL, Ham RG (1976). Methods for reducing the serum requirement of growth *in vitro* of non-transformed diploid fibroblasts. *Dev. Biol. Stand.* **37**:97–98.

McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG (1976). Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:2023–2027.

McLean JS, Frame MC, Freshney RI, Vaughan PFT, Mackie AE (1986). Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res.* **6**:1101–1106.

Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967). Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**:519–524.

Morgan JG, Morton HJ, Parker RC (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture; I: Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**:1.

Moscona AA (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* **3**:535.

Moscona AA, Piddington R (1966). Stimulation by hydrocortisone of premature changes in the developmental pattern of glutamine synthetase in embryonic retina. *Biochim. Biophys. Acta* **121**:409–411.

Newby D, Marks L, Lyall F (2005). Dissolved oxygen concentration in culture medium: Assumptions and pitfalls. *Placenta* **26**:353–357.

Nie Z (1992). Fetuin: Its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Physiol.* **263**(3 Part 1):C551–C562.

Nienow AW (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* **50**:9–33.

Olbryt M, Habryka A, Student S, Jarząb M, Tyszkiewicz T, Lisowska KM (2014). Global gene cexpression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia. *PLoS ONE* **9**(8):e105104.

Parker RC, Castor LN, McCulloch EA (1957). Altered cell strains in continuous culture. Special publications. *NY Acad. Sci.* **5**:303–313.

Paul J (1975a). *Cell and tissue culture.* Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 139–143.

Paul, J. (1975b). *Cell and tissue culture.* Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 172–184.

Preissmann A, Wiesmann R, Buchholz R, Werner RG, Noe W (1997). Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers. *Cytotechnology* **24**:121–134.

Puck TT, Marcus PI (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**:432–437.

Radisic M, Park H, Chen F, Salazar-Lazzaro JE, Wang Y, Dennis R, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2006). Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue Eng.* **12**:2077–2091.

Richter A, Sanford K, Evans VJ (1972). Influence of oxygen and culture media on plating efficiency of some mammalian tissue cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* **49**: 1705–1712.

Sakwe AM, Koumangoye R, Goodwin SJ, Ochieng J (2010). Fetuin-A ({alpha}2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells. *J. Biol. Chem.* **285**:41827–41835.

Shipman C (1973). Control of culture pH with synthetic buffers. In KruseP, PattersonMK (eds.), *Tissue culture methods & applications.* New York: Academic Press, p.710.

Sigma-Aldrich: *Antibiotic selection* (www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/learning-center/antibiotic-selection.html).

Sinha MK, Buchanan C, Raineri-Maldonado C, Khazanie P, Atkinson S, DiMarchi R, Caro JF (1990). IGF-II receptors and IGF-II-stimulated glucose transport in human fat cells. *Am. J. Physiol.* **258**:E534–E542.

Speirs V, Ray KP, Freshney RI (1991). Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts. *Br. J. Cancer* **64**:693–699.

Stampfer M, Halcones RG, Hackett AJ (1980). Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* **16**:415–425.

Stanners CP, Eliceri GL, Green H (1971). Two types of ribosome in mouse–hamster hybrid cells. *Nat. New Biol.* **230**:52–54.

Takahashi K, Okada TS (1970). Analysis of the effect of "conditioned medium" upon the cell culture at low density. *Dev. Growth Differ.* **12**:65–77.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990). Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* **89**:573–578.

Trowell OA (1959). The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.* **16**:118–147.

Varga K, Goldstein RF, Jurkuvenaite A, Chen L, Matalon S, Sorscher EJ, Bebok Z, Collawn JF (2008), Enhanced cell-surface stability of rescued DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones. *Biochem. J.* **410**:555–564.

Varga Weisz PD, Barnes DW (1993). Characterization of human plasma growth inhibitory activity on serumfree mouse embryo cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**:512–516.

Waymouth C (1959). Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB752/1). *J. Natl. Cancer Inst.* **22**:1003.

Waymouth C (1970). Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro* **6**:109–127.

Waymouth C (1979). Autoclavable medium AM 77B. *J. Cell Physiol.* **100**:548–550.

Wyllie FS, Bond JA, Dawson T, White D, Davies R, Wynford-Thomas D (1992). A phenotypically and karyotypically stable human thyroid epithelial line conditionally immortalized by SV40 large T antigen. *Cancer Res.* **52**:2938–2945.

Yamada KM, Geiger B (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:76–85.

Yuspa SH, Koehler B, Kulesz-Martin M, Hennings H (1981). Clonal growth of mouse epidermal cells in medium with reduced calcium concentration. *J. Invest. Dermatol.* **76**:144–146.

Zhambalova AP, Darevskaya AN, Kabaeva NV, Romanov YA, Buravkova LB (2009). Specific interaction of cultured human mesenchymal and hemopoietic stem cells under conditions of reduced oxygen content. *Bull. Exp. Biol. Med.* **147**(4):525–530.

Zigler JS Jr, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Gery I (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **21**:282–287.

（陈实平　译）

第9章

无血清培养基

尽管现在大多数细胞系仍然需要用含血清的培养基培养，但用无血清培养基培养细胞常常也是可行的（表 9.1、表 9.2）。回顾历史，对无血清培养基的需求来自几个方面：各实验室之间需要标准化的培养基；为特定的细胞系提供特殊的培养基；限制各种天然组分及可能含有的微生物污染。这些需求促进了更为复杂的多种培养基的产生，诸如 Morgan 等（1950）为培养鸡胚细胞设计的 M199，Parker 等（1957）设计的 CMRL1066、NCTC109（Evans et al.，1956）、Waymouth's MB572/1（1959），以及 Birch 和 Pirt（1971）针对 L929 小鼠成纤维细胞设计的 NCTC135（Evans and Bryant，1965）、用于中国仓鼠卵巢细胞的克隆化培养基 Ham's F10（Ham，1963）和 F12（Ham，1965）等。用于培养 HeLa 人宫颈癌细胞的无血清培养基也已产生（Blaker et al.，1971；Higuchi，1977）。

虽然连续细胞系在适应无血清条件之后，可能会出现一定程度的细胞选择作用，但对 MCDB 系列培养基（Ham and McKeehan，1978）（表 9.1）、以 DMEM/F12 为基液的 Sato 培养基（Barnes and Sato，1980），以及基于 RPMI1640 的培养基（Carney et al.，1981；Brower et al.，1986）（表 9.2）的研制经验均证明：如果对培养基的营养成分和激素进行适当的修改，血清可被减少或去除，而不会出现明显的细胞选择作用（Barnes et al.，1984a，1984b，1984c，1984d；Cartwright and Shah，1994；Mather，1998）。这些培养基也为特殊类型细胞的原代培养提供了可选择的条件。通过培养人成纤维细胞（Ham，1984），小鼠和人的正常或肿瘤细胞（Barnes and Sato，1980）、淋巴母细胞（Iscove and Melchers，1978），以及几种不同的原代培养物（Mather and Sato，1979a，1979b；Sundqvist et al.，1991；Gupta et al.，1997；Vonen et al.，1992）获得了一些培养基的特殊配方，如 MCDB110（Bettger et al.，1981），这些配方可在无血清或其中一些加了蛋白质的条件下使用（Tsao et al.，1982；Benders et al.，1991）。目前该统计表已涵盖了许多类型的细胞，许多培养基都已有市售（参见表 9.5，亦可见表 25.1 和补充材料中的附录III）。此外，为满足生物制药在体外生产时需要去除动物蛋白的要求，还针对一些连续细胞系，如 CHO（Keen and Rapson，1995）、HEK-293（Cervera et al.，2013）和杂交瘤设计了许多配方（Froud，1999；Ikonmou et al.，2003；Shah，1999），对一些安全问题的关注进一步激发了这方面的研究（Merten，1999）。

表 9.1　无血清培养基配方示例

培养基		MCDB110	MCDB131	MCDB170	MCDB202	MCDB302	MCDB402	WAJC404	MCDB153	Iscove's	LHC-9
细胞类型		人肺成纤维细胞	人血管内皮细胞	乳腺上皮细胞	鸡胚成纤维细胞	CHO 细胞	3T3 细胞	前列腺上皮细胞[1]	角质细胞	淋巴细胞	支气管上皮细胞
参考文献		Bettger et al.，1981	Knedler and Ham，1987 Gupta et al.，1997	Hammond et al.，1984	McKeehan and Ham，1976b	Hamilton and Ham，1977	Shipley and Ham，1983	McKeehan et al.，1984；Chaproniere and McKeehan，1986	Peehl and Ham，1980	Iscove and Melchers，1978	Lechner and LaVeck，1985
组分	相对分子质量										
氨基酸类											
L-丙氨酸	89	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	2.8E-04	1.0E-04	
L-精氨酸	211	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	1.0E-03	1.0E-03	4.0E-04	2.0E-03
L-天冬酰胺	132	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-03	1.0E-03	1.1E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.9E-04	1.0E-04
L-天冬氨酸	133	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	2.3E-04	3.0E-05
L-半胱氨酸	176	5.0E-05	2.0E-04	7.0E-05	2.0E-04	1.0E-04			2.4E-04		2.4E-04
L-胱氨酸	240			2.0E-04	2.0E-04		4.0E-04	2.4E-04		2.9E-04	
L-谷氨酸	147	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	5.1E-04	1.0E-04
L-谷氨酰胺	146	2.5E-03	1.0E-02	2.0E-03	1.0E-03	3.0E-03	5.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	4.0E-03	6.0E-03
甘氨酸	75	3.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-04	1.0E-04
L-组氨酸	210	1.0E-04	2.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	8.0E-05	8.0E-05	2.0E-04	1.6E-04
L-异亮氨酸	131	3.0E-05	5.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-03	1.5E-05	1.5E-05	8.0E-04	3.0E-05
L-亮氨酸	131	1.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	5.0E-04	5.0E-04	8.0E-04	1.0E-03
L-赖氨酸	183	2.0E-04	1.0E-03	2.0E-04	2.0E-04	2.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	8.0E-04	2.0E-04
L-甲硫氨酸	149	3.0E-05	1.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	2.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	2.0E-04	6.0E-05
L-苯丙氨酸	165	3.0E-05	2.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	4.0E-04	6.0E-05
L-脯氨酸	115	3.0E-04	1.0E-04	5.0E-05	5.0E-05	3.0E-04		3.0E-04	3.0E-04	3.5E-04	3.0E-04
L-丝氨酸	105	1.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	6.0E-04	6.0E-04	4.0E-04	1.2E-03
L-苏氨酸	119	1.0E-04	1.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	5.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	8.0E-04	2.0E-04
L-色氨酸	204	1.0E-05	2.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	1.5E-05	1.5E-05	7.8E-05	3.0E-05
L-酪氨酸	181	3.5E-05	1.0E-04	5.0E-05	5.0E-05	4.4E-05	2.0E-04	1.5E-05	1.5E-05	4.6E-04	3.0E-05
L-缬氨酸	117	1.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	8.0E-04	6.0E-04

续表

培养基		MCDB110	MCDB131	MCDB170	MCDB202	MCDB302	MCDB402	WAJC404	MCDB153	Iscove's	LHC-9
细胞类型		人肺成纤维细胞	人血管内皮细胞	乳腺上皮细胞	鸡胚成纤维细胞	CHO 细胞	3T3 细胞	前列腺上皮细胞[1]	角质细胞	淋巴细胞	支气管上皮细胞
参考文献		Bettger et al.，1981	Knedler and Ham，1987 Gupta et al.，1997	Hammond et al.，1984	McKeehan and Ham，1976b	Hamilton and Ham，1977	Shipley and Ham，1983	McKeehan et al.，1984；Chapronière and McKeehan，1986	Peehl and Ham，1980	Iscove and Melchers，1978	Lechner and LaVeck，1985
组分	相对分子质量										
维生素类											
生物素	244	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	6.0E-08	6.0E-08	5.3E-08	6.0E-08
氧化胆碱	140	1.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	2.0E-05	2.0E-04
叶酸	441		1.0E-04			3.0E-06		1.8E-06	1.8E-06	9.1E-06	1.8E-06
亚叶酸	512	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-08	1.0E-08		1.0E-06				
myo-肌醇	180	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04
烟碱	122	5.0E-05	5.0E-05	5.0E-05	5.0E-05	3.0E-07	5.0E-05	3.0E-07	3.0E-07	3.3E-05	3.0E-07
泛酸	238	1.0E-06	5.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06	5.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.7E-05	1.0E-06
吡哆醛	204									2.0E-05	
吡哆醇	206	3.0E-07	1.0E-05	3.0E-07	3.0E-07	3.0E-07	1.0E-04	3.0E-07	3.0E-07		3.0E-07
核黄素	376	3.0E-07	1.0E-08	3.0E-07	3.0E-07	1.0E-07	1.0E-06	1.0E-07	1.0E-07	1.1E-06	1.0E-07
硫胺素	337	1.0E-06	1.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-04	1.0E-06	1.0E-06	1.2E-05	1.0E-06
维生素 E	430	1.4E-07									
类维生素 A	300										3.3E-07
醋酸视黄醇	329	4.2E-07									
维生素 B_{12}	1355	1.0E-07	1.0E-08	1.0E-07	1.0E-07	1.0E-07	1.0E-08	3.0E-07	3.0E-07	9.6E-09	3.0E-07
抗氧化剂类											
二硫苏糖醇	154	6.5E-06									
谷胱甘肽	307	6.5E-07									
无机盐类											
$CaCl_2$	147	1.0E-03	1.6E-03	2.0E-03	2.0E-03	6.0E-04	1.6E-03	1.3E-04	3.0E-05	1.5E-03	1.1E-04
KCl	75	5.0E-03	4.0E-03	3.0E-03	3.0E-03	3.0E-03	4.0E-03	1.5E-03	1.5E-03	4.4E-03	1.5E-03

续表

培养基		MCDB110	MCDB131	MCDB170	MCDB202	MCDB302	MCDB402	WAJC404	MCDB153	Iscove's	LHC-9
细胞类型		人肺成纤维细胞	人血管内皮细胞	乳腺上皮细胞	鸡胚成纤维细胞	CHO 细胞	3T3 细胞	前列腺上皮细胞[1]	角质细胞	淋巴细胞	支气管上皮细胞
参考文献		Bettger et al.，1981	Knedler and Ham，1987 Gupta et al.，1997	Hammond et al.，1984	McKeehan and Ham，1976b	Hamilton and Ham，1977	Shipley and Ham，1983	McKeehan et al.，1984；Chaproniere and McKeehan，1986	Peehl and Ham，1980	Iscove and Melchers，1978	Lechner and LaVeck，1985
组分	相对分子质量										
无机盐类											
KNO_3	160					1.6E-08				7.5E-07	
$MgCl_2$	203					6.0E-04		6.0E-04	6.0E-04		2.2E-02
$MgSO_4$	247	1.0E-03	1.0E-02	1.5E-03	1.5E-03	6.1E-10	8.0E-04			8.1E-04	
NaCl	58	1.1E-01	1.1E-01	1.2E-01	1.2E-01	1.3E-01	1.2E-01	1.2E-01	1.2E-01	7.7E-02	1.0E-01
$NaHCO_3$	84	—[2]	1.4E-02	—[2]	—[2]	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	3.6E-02	1.2E-02
Na_2HPO_4	120	3.0E-03	5.9E-04	5.0E-04	5.0E-04	1.2E-03	5.0E-04	2.0E-03	2.0E-03	1.0E-03	2.0E-03
微量元素类											
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	160	1.0E-09	7.5E-09	1.0E-09	1.0E-09		5.0E-09	1.0E-09	1.1E-08		1.0E-08
$FeSO_4$	278	5.0E-06	1.0E-06	5.0E-06	5.0E-06	3.0E-06	1.0E-06	5.0E-06	5.0E-06		5.4E-04
$MnSO_4 \cdot H_2O$	169	1.0E-09	1.2E-09	5.0E-10	5.0E-10		1.0E-09	1.0E-09	1.0E-09		1.0E-09
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1236	1.0E-09	3.0E-09	1.0E-09	1.0E-09	1.0E-08	3.0E-09	1.0E-09	1.0E-09		1.0E-09
$NiCl_2$	238	5.0E-10	4.2E-10	5.0E-12	5.0E-12		3.0E-10	5.0E-10	5.0E-10		5.0E-10
H_2SeO_3	129	3.0E-08		3.0E-08	3.0E-08	1.3E-08	1.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	1.0E-07	3.0E-08
Na_2SiO_3	122	5.0E-07	2.3E-05	5.0E-07	5.0E-07		1.0E-05	5.0E-07	5.0E-07		5.0E-07
$SnCl_2$	190	5.0E-10		5.0E-12	5.0E-12			5.0E-10	5.0E-10		5.0E-10
NH_4VO_3	117	5.0E-09	5.1E-09	5.0E-09	5.0E-09	1.0E-08	5.0E-09	5.0E-09	5.0E-09		5.0E-09
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	288	5.0E-07	1.0E-09	1.0E-07	1.0E-07	3.0E-06	1.0E-06	5.0E-07	5.0E-07		4.8E-07
脂类和前体											
胆固醇	387	7.6E-06									
乙醇胺	61			1.0E-04					1.0E-04		
亚油酸	280			2.0E-07	2.0E-07	3.0E-07	3.0E-07				

续表

培养基		MCDB110	MCDB131	MCDB170	MCDB202	MCDB302	MCDB402	WAJC404	MCDB153	Iscove's	LHC-9
细胞类型		人肺成纤维细胞	人血管内皮细胞	乳腺上皮细胞	鸡胚成纤维细胞	CHO 细胞	3T3 细胞	前列腺上皮细胞[1]	角质细胞	淋巴细胞	支气管上皮细胞
参考文献		Bettger et al.，1981	Knedler and Ham，1987 Gupta et al.，1997	Hammond et al.，1984	McKeehan and Ham，1976b	Hamilton and Ham，1977	Shipley and Ham，1983	McKeehan et al.，1984；Chaproniere and McKeehan，1986	Peehl and Ham，1980	Iscove and Melchers，1978	Lechner and LaVeck，1985
组分	相对分子质量										
脂类和前体											
硫辛酸	206	1.0E-08	1.0E-08	1.0E-08	1.0E-08	9.8E-07	1.0E-08	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06
磷酸乙醇胺	141			1.0E-04							5.0E-07
大豆卵磷脂（μg/mL）		6									
大豆脂（μg/mL）										50	
鞘磷脂（μg/mL）		1									
激素和生长因子类											
EGF（ng/mL）		30		10				25	25		5
肾上腺素	183										2.7E-06
氢化可的松[3]	362	5.0E-07		1.4E-07				5.0E-07	1.4E-07		2.0E-07
胰岛素（μg/mL）		1		5				10	5		5
泌乳素（μg/mL）		1		5							
PGE_1	355	2.5E-08							2.5E-08		
三碘甲状腺氨酸	673										1.0E-08
核苷类											
腺嘌呤 SO_4	184	1.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06	1.8E-04	1.8E-04		1.8E-04
次黄嘌呤	136					3.0E-05					
胸腺嘧啶	242	3.0E-07	1.0E-07	3.0E-07	3.0E-07		1.0E-06	3.0E-06	3.0E-06		3.0E-06
能量代谢类											
D-葡萄糖	180	4.0E-03	5.6E-03	8.0E-03	8.0E-03	1.0E-02	5.5E-03	6.0E-03	6.0E-03	2.5E-02	6.0E-03
磷酸烯醇丙酮酸盐	190	1.0E-05									
乙酸钠 $3H_2O$	136					1.0E		3.7E-03	3.7E-03		3.7E-03
丙酮酸钠	110	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03	5.0E-04	1.1E+02		5.0E-04	5.0E-04	1.0E-03	5.0E-04

续表

培养基		MCDB110	MCDB131	MCDB170	MCDB202	MCDB302	MCDB402	WAJC404	MCDB153	Iscove's	LHC-9
细胞类型		人肺成纤维细胞	人血管内皮细胞	乳腺上皮细胞	鸡胚成纤维细胞	CHO 细胞	3T3 细胞	前列腺上皮细胞[1]	角质细胞	淋巴细胞	支气管上皮细胞
参考文献		Bettger et al.，1981	Knedler and Ham，1987；Gupta et al.，1997	Hammond et al.，1984	McKeehan and Ham，1976b	Hamilton and Ham，1977	Shipley and Ham，1983	McKeehan et al.，1984；Chaproniere and McKeehan，1986	Peehl and Ham，1980	Iscove and Melchers，1978	Lechner and LaVeck，1985
组分	相对分子质量										
其他化合物类											
霍乱毒素	约 90 000							2.0E-10			
HEPES，钠盐	260	3.0E-02		3.0E-02	3.0E-02			2.8E-02	2.8E-02	2.5E-02	2.3E-02
酚红	376	3.3E-06	3.3E-05	3.3E-06	3.3E-06	3.3E-06	3.3E-05	3.3E-05	3.3E-05	4.0E+05	3.3E-06
腐胺 2HCl	161	1.0E-09	1.2E-09	1.0E-09	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06
蛋白补充物类											
BPE[4]（μg P/mL）		70						25			35
BSA（mg/mL）										0.5~10	
透析的 FBS（μg P/mL）									1		
转铁蛋白，Fe^{3+}饱和（μg/mL）				5						30~300	10
气相											
CO_2	44	2%	5%	2%	2%	5%	5%	5%	5%	10%	5%

缩略词：BPE. 牛垂体抽提物；BSA. 牛血清白蛋白；EGF. 表皮生长因子；FBS. 胎牛血清。参考文献见正文

1. 亦见完全 PFMR-4A（Peehl，2002）

2. 尽管配方中没有指定碳酸氢盐，但在 2% CO_2 气相条件下，可用 20mmol/L NaOH 中和培养基，结果相当于加入 10mmol/L 碳酸氢钠，达到 pH 7.4

3. 也可使用氢化可的松的可溶性类似物，如地塞米松

4. BPE 可用绵羊泌乳刺激素代替。绝大多数浓度采用摩尔浓度，并以科学计数法表示，如 3.0E-2=3.0×10^{-2}=30mmol/L。给出的分子量是母体化合物的分子量；虽然一些配方中使用相应盐或含水化合物，但摩尔浓度仍是相同的。不使用摩尔浓度时的单位在组分栏给出

表 9.2 无血清培养基示例：添加组分的基本培养基

培养基	HITES	ACL-3		N3	G3	K-1	K-2			
参考文献	Carney et al.，1981	Brower et al.，1996	Masui et al.，1986b	Bottenstein，1984	Michler-Stuke and Bottenstein，1982	Taub，1984	Taub，1984	Chopra and Xue-Hu，1993	Robertson and Robertson，1995	Naeyaert et al.，1991
细胞类型	人小细胞肺癌	人非小细胞肺癌	人肺腺癌	人成神经细胞瘤 LA-N-1	大鼠神经胶质细胞	MDCK（狗肾）	LLC-PK（猪肾）	人腮腺	人前列腺	人黑色素细胞瘤
基本培养基	RPMI1640	RPMI1640	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM	DMEM/F12	DMEM/F12	MCDB153	α-MEM/F12	M199
补充物										
Arg·VP（μU/mL）							10			
BPE（μgP/mL）								25	25	
BSA（mg/mL）		5.0			0.3					
霍乱毒素										1.0E-09
胆固醇							1.0E-08			
EGF（ng/mL）		10						10	10	1
肾上腺素										
雌二醇	1.0E-08									
乙醇胺			5.0E-07						1.0E-03	
FGF-2（碱性 FGF）（ng/mL）										10
胰增血糖素（μg/mL）			0.2							
谷氨酸（额外的）		2.0E-03							2.0E-03	
氢化可的松	1.0E-08	5.0E-08				5.0E-08	2.0E-07	1.4E-06	1.0E-06	1.4E-06
胰岛素（μg/mL）	5.0	20.0	5.0	5.0	0.5	5.0	25.0	5.0	5.0	10.0
丙酮酸钠（额外的）		5.0E-04								

续表

培养基	HITES	ACL-3		N3	G3	K-1	K-2			
参考文献	Carney et al.，1981	Brower et al.，1996	Masui et al.，1986b	Bottenstein，1984	Michler-Stuke and Bottenstein，1982	Taub，1984	Taub，1984	Chopra and Xue-Hu，1993	Robertson and Robertson，1995	Naeyaert et al.，1991
细胞类型	人小细胞肺癌	人非小细胞肺癌	人肺腺癌	人成神经细胞瘤 LA-N-1	大鼠神经胶质细胞	MDCK（狗肾）	LLC-PK（猪肾）	人腮腺	人前列腺	人黑色素细胞瘤
补充物										
Na_2SeO_3	3.0E-08	2.5E-08	2.50E-08	3.0E-08						
磷酸乙醇胺									1.0E-04	
孕酮				2.0E-08	2.0E-07					
泌乳素										
前列腺素 E_1						7.0E-08				
腐胺				1.0E-04	1.0E-07					
转铁蛋白，Fe^{3+}饱和（μg/mL）	100	10		50	100	5	10		5	10
三碘甲状腺氨酸		1.0E-10	5.0E-10		4.9E-07	5.0E-12	1.0E-09			1.0E-09
甲状腺素					4.5E-07					

注：绝大多数浓度采用摩尔浓度，并以科学计数法表示，如 3.0E-2=3.0×10^{-2}=30mmol/L。给出的分子量是母体化合物的分子量；虽然一些配方中使用相应盐或含水化合物，但摩尔浓度仍是相同的。不使用摩尔浓度时的单位在组分栏给出。氢化可的松的可溶性类似物，如地塞米松，也可使用

缩略词：Arg·VP. 精氨酸抗利尿激素；BPE. 牛垂体抽提物；BSA. 牛血清白蛋白；EGF. 表皮生长因子；FGF. 成纤维细胞生长因子

9.1 血清的缺点

在培养基中使用血清有许多缺点。

（1）生理变化。血清中的主要成分诸如白蛋白、转铁蛋白已经知道得很清楚，但是其中含有的大量微量成分对细胞生长也起到巨大作用（表 8.6），并影响物质的检测（参见图 24.4）。这些成分包括营养物质（氨基酸、核苷、糖等）、蛋白质、肽生长因子、激素、无机物、脂类，它们的含量和作用还没有完全确定。

（2）储藏寿命和稳定性。每批血清都不同，最好的血清可保存一年，但也许那时它已经变质。如果已经变质就必须更换，也许可以挑选到另一批相似的血清，但绝不会同第一批血清完全相同。

（3）质量控制。更换血清时需做大量的测试以确保替换的血清与前一批血清最为相似，这包括用几种不同的细胞系做几项实验（如细胞增殖、细胞产量、贴瓶率、特殊功能实验等，参见 10.6.3 节）。

（4）特异性。如果培养的细胞类型不止一种，每种细胞可能需要使用不同批号的血清，这将导致需要同时保存不同批号的血清，而在实验中同时培养不同类型的细胞将会使问题更加复杂。

（5）可利用率。牧区干旱、在牛群中疾病流行及政治或经济等原因会周期性地影响血清的供应，因此随时会产生许多问题，诸如限制可利用的血清数量和可选择的血清批数，尤其在血清需求量高的时候这种问题更为严重。现在，血清的需求量不断增加，很可能会超出供给量，除非大多数商业应用者采用无血清培养基。尽管一个普通的研究性实验室每年仅需要 100~200L 血清，但一个商业性生物科技实验室一周就可以用掉等量或更多的血清。

（6）后期加工。血清的存在对于纯化产物是一个主要的障碍，甚至可能影响产物的药物学效应。

（7）污染。血清经常被病毒污染，其中许多可能对细胞培养无害，但表明存在不受操作者控制的未知因素（Merten，1999）。令人高兴的是，血清灭菌技术的改进实际上已经避免了从正规厂家提供的血清污染支原体的可能，但病毒感染仍然是个问题，尽管有些供应商声称某些滤器可以去除病毒（Pall Gelman）。由于疯牛病是可传染的，因此运往美国、澳大利亚的细胞培养物和血清产品必须提供其原产地及血清批号。由于许多病毒是在欧洲和北美的乳牛中发现的，而新西兰还没发现，因此来自新西兰的牛血清其内源性病毒感染率可能最低。此外，在牛的饲养过程中持续使用抗生素，也存在污染的风险，如四环素污染（L. Steeb，个人通信），它有毒或在进行一些基因构建时改变基因的转录。

（8）价格。价格问题常被列为使用血清的一个缺点。确实，血清是培养基中最贵的成分（是化学成分价格的 10 倍多），但是如果用指定的成分来替换血清，那么这些成分的总价格和血清相当。然而，随着转铁蛋白、硒、胰岛素等市场需要量的不断增加，这些物质的价格很可能降低，无血清培养基也将会更便宜。而随着重组生长因子的实用性及市场需求的增加，也将有助于降低其价格。

（9）生长抑制剂。血清不仅对细胞生长起促进作用，而且也起抑制作用。尽管通常情况下，血清的主要作用是激活细胞生长，但血清的总体效应是抑制和激活作用的总和。血清中的一些物质，如血小板生长因子（PDGF）可能是成纤维细胞的有丝分裂原，而其他成分可能抑制细胞的生长。存在于胎儿血清中含量约为 1×10^{-8}mol/L 的氢化可的松在高细胞密度时对许多细胞如神经

胶质细胞（Guner et al.，1977）和肺上皮细胞（McLean et al.，1986）起抑制作用（尽管在细胞密度低时可能起促进作用），血小板释放的 TGF-β 也可对许多上皮细胞（Pfeifer et al.，1989；Masui et al.，1986a，1986b）起抑制作用。

（10）标准化。由于每批血清均不相同，要在不同操作时间和不同的实验室实现实验程序及生产程序的标准化极为困难。

9.2 无血清培养基的优点

所有上述问题都可通过不使用血清及其他动物源性产物而得到控制，同时无血清培养基还有两个主要的优点。

（1）标准培养基的定义。无论在何处、由何人制备，都是使用纯的组分、标准的培养基配方，这不但使工业生产过程的验证变得容易，也意味着实验室之间可以复制条件，重复及验证实验数据。

（2）选择性培养基。控制过度生长从而选择性地促进一种特殊类型细胞的生长，是无血清培养基的主要优点之一（表 9.1、表 9.2）。用 MCDB170（Hammon et al.，1984）和 153 培养基（Peehl and Ham，1980）培养乳腺细胞及皮肤细胞可有效地抑制成纤维细胞的过度生长；黑素细胞能在没有成纤维细胞和角质细胞的条件下培养（Naeyaet et al.，1991）；在造血细胞培养中，通过挑选某种适当的生长因子或一组生长因子，可选择性地使单一细胞谱系甚至某个分化阶段的细胞生长（参见 26.4 节和短篇综述 25.1）。现在许多这类选择性培养基已有商业产品以适应培养各种类型的细胞（参见表 9.5，25.1 节）。

（3）调节细胞增殖与分化。无血清培养基除了对细胞类别具有选择性能外，还具有调节细胞增殖或是分化的可能性，可通过选择生长因子的类型、浓度及其他诱导因子而使促进细胞生长增殖的培养基转换为诱导细胞分化的培养基。

9.3 无血清培养基的缺点

无血清培养基也不是没有缺点。

（1）培养基种类繁多。每一种类型的细胞都需要一种培养基配方，例如，对恶性肿瘤细胞的培养，每一类型的肿瘤细胞甚至同一类型的不同肿瘤细胞都需要不同的培养基。这种特异性有利于分离特异细胞，但它给实验室初建或保存不同来源的细胞系带来了困难。

（2）选择性。不幸的是，过渡到无血清的实验条件并不像想象的那么直截了当。一些培养基可能会选择某种子细胞系，而这种子细胞系并不是整个细胞群体的典型代表。即使在连续细胞系的培养中也需要对无血清培养基做一些选择。

（3）试剂纯度。去除血清后对试剂、水的纯度和仪器的清洁度的要求更高，因为在去除血清的时候，也同时去除了一些血清蛋白可能具有的保护、解毒作用。毫无疑问，虽然除去这些作用是可取的，但不是总能实现，这要取决于试剂的来源。

（4）细胞增殖。通常在无血清培养基中细胞生长缓慢（Gottipanula et al.，2014；Chowdhury et al.，2012），有限细胞系的传代次数也减少（Fu et al.，2003）。

（5）配方。虽然有时我们知晓某种市售培养基是根据所发表文章中的培养基配制的，但并不总能获得其准确配方。

9.4 血清的替代

血清中的主要成分（参见8.5节）包括：①黏附因子，如纤连蛋白；②肽类激素和生长因子，如胰岛素、类胰岛素生长因子（TGF）、血小板生长因子、转化生长因子，它们可调节细胞生长和分化；③必需的营养物质，如无机物、维生素、脂肪酸和中间代谢物；④激素类，如胰岛素、氢化可的松、雌激素、三碘甲状腺氨酸等，这些成分可调节跨膜转运、分化及细胞表面的组成。上述成分中的一部分包含在无血清培养基配方中，而另一部分则可能需要另外添加或调整使用浓度。

9.4.1 无血清培养基的商业供应

现在大约有50个供应商（参见表9.5，25.1节和补充材料中的附录III）在生产无血清培养基（另见SEFREC，2014）。其中一些是采用固定的配方，如用于培养内皮细胞的MCDB131（Sigma-Aldrich）、用于培养支气管上皮细胞的LHC-9（Life Technologies）；而另一些配方是私人专利，如BD Select CHO培养基（BD Biosciences）和Gibco CD Hybridoma AGT（Life Technologies）。许多无血清培养基最初是为培养杂交瘤细胞而设计，这时产物的组分是很重要的，是血清蛋白中所没有的，而其他一些无血清培养基适合于培养其他类型的细胞。尽管可以从文献中查到某种培养基适合于某种特殊类型的细胞（参见表9.5，25.1节），但培养基的配方往往是商业机密，你只能依赖于供应商的推荐，或最好用自己的细胞做几次传代培养筛选几种培养基，后一种方法花费较大，但如果决定长期使用这种细胞系做实验，还是应该选用这种方法。搜寻SEFREC（2005）或许有助于列出一个测试的简短名单。

对无血清培养基供应商所做的质控进行确认是非常重要的。对培养基而言，最好是用你希望培养的细胞做检测（如角质细胞生长培养基应该用角质细胞检测）。一些供应商，如Clonetics（Lonza）、Cascade、Cell Applications、ECACC及PromoCell会采用适宜在这种培养基中生长的细胞进行测试，以确保质控的正确，但另一些供应商可能只会采用常规的连续细胞系做测试，这种情况下要在购买之前自己先做质控。

9.4.2 血清替代物

目前已有许多可完全或部分替代传统培养基中血清成分的商业产品（表9.3，另见补充材料的附录III：血清替代物）。有些情况下产品有明确的配方，例如，Corning ITS Premix（Fisher Scientific），Nutridoma（Roche Applied Science）和血清替代物1、2、3（Sigma-Aldrich），其他情况下，配方被视为专有资料，如果不能了解组分的细节，最好避免使用血清替代物。MegaCell系列培养基是在MEM、DMEM、RPMI1640、MEM或DMEM/F12混合培养基中添加了生长因子、附加的氨基酸（Sigma-Aldrich），证明它们确实能够使血清的使用浓度降低。

表 9.3 血清替代物

商标	供应商	内含物	推荐用于
BIT 9500	StemCell Technologies	牛血清白蛋白、重组人干扰素、人转铁蛋白（铁饱和的）、Iscove's MDM	人和小鼠造血细胞
CDM-HD	FiberCell Systems	维生素、辅酶、微量元素、微量营养素、重组生长因子、碳水化合物（包括葡萄糖）	在中空纤维生物反应器中高细胞密度培养
Chemically Defined Lipid Concentrate	Life Technologies	花生四烯酸、胆固醇、DL-α-维生素 E、乙醇、亚油酸、亚麻酸、（肉）豆蔻酸、油酸、棕榈酸、棕榈油酸、聚醚 F-68、硬脂酸、吐温-80	昆虫细胞、CHO、杂交瘤细胞
Ex-cyte	Mllipore（Merck Millipore）	胆固醇、脂蛋白和脂肪酸	杂交瘤、骨髓瘤、CHO 和 HEK-293 细胞
FetalPlus	Valley Biomedical	未规定	以 Vero 细胞做实验
FreeAdd	Biowest	未规定；化学成分限定	大多数细胞系，干细胞、原代细胞和昆虫细胞
ITSE Animal-free	Ventria Bioscience	重组胰岛素和转铁蛋白，硒、乙醇胺	CHO、杂交瘤、HEK-293、Vero、大鼠上皮细胞、HT-29、成纤维细胞、MDCK、仓鼠细胞、PER.C6、干细胞
ITS Premix	Corning；Fisher Scientific	胰岛素、人转铁蛋白、亚硒酸	以 HeLa 细胞做实验
KnockOut	Life Technologies	含有生长因子的具有明确配方的无血清培养基	ESCs 和 iPSCs
Nuserum	Corning；Fisher Scientific	未规定	Mab 和病毒的生产、筛选、转染
Nutridoma	Roche Applied Sciences	白蛋白、胰岛素、转铁蛋白及其他明确的有机物和无机物	鼠的骨髓瘤和杂交瘤细胞
Onco-CYTE	Millipor	?	?
PeproGrow-1	PeproTech		
PluriQ	Amsbio	未规定	hESCs，iPSCs
Sheff-CHO ACF	Sheffield Bioscience（Kerry）	小麦水解物和人血清白蛋白	CHO
Sheff-Vax ACF	Sheffield Bioscience	重组生长因子	MDCK、BHK-21；HEK-293
SR1，SR2	Sigma-Aldrich	热处理的牛血清白蛋白、热处理的牛转铁蛋白和牛胰岛素	常规细胞培养、干细胞培养
SR3	Sigma-Aldrich	人血清白蛋白、人转铁蛋白、人重组胰岛素	停泊依赖性细胞和悬浮细胞
SR100	PeproTech	未规定	HEK-293、HeLa、A549
SSS	Irvine Scientific	84%人血清白蛋白，16% α-球蛋白和 β-球蛋白	小鼠胚胎实验
TCM，TCH	MP Biomedicals		干细胞
Ultroser	Pall Corporation	半限定成分	羊膜穿刺、染色体核型分析，也用于许多其他细胞的实验
基质包被产品（参见表 7.1）	BD Biosciences；MP Biomedicals；Life Technologies；Sigma-Aldrich	纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原；基质胶（层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原、蛋白聚糖、生长因子）	用于许多细胞类型；层粘连蛋白主要用于上皮细胞和分化研究

目前可供选择的无血清培养基和血清替代物的种类繁多，不可能针对特异细胞培养而作出某种推荐，虽然 SEFREC 数据库在这方面（SEFREC，2014）可能有帮助。最好的方法是检索文献、与供应商联系、获取与已报道的产品最为相关的样品，然后通过自己的分析筛选产品（如生长、存活和特殊功能实验）。

生物技术应用过程中要进行大批量培养，此时可利用氨基酸水解酶（参见 8.7.1 节）帮助减少或限制血清用量。这些水解酶有一个优点：可高温高压消毒，但成分不确定。

9.4.3 无血清传代培养

对于在无血清条件下的增殖性贴壁细胞的传代可能要修正一下它们的传代方案，因为血清中含有的一些成分显然不同于那些相关的营养成分或生长因子。

黏附因子 如果除掉血清，可能就必须用 25~50μg/mL 的纤连蛋白或 1~5μg/mL 的层粘连蛋白来处理塑料培养器皿的生长表面，或直接加在培养基中（Levy et al.，2014）（参见方案 25.9-Su）。纤连蛋白还可用化学方法结合至培养皿的底层（Kandel et al.，2014）。用 1mg/mL 的多聚 L-赖氨酸预处理塑料培养器皿，可增强人二倍体成纤维细胞的存活率（McKeehan and Ham，1976a）（另见 7.2 节）。

蛋白酶抑制剂 利用胰蛋白酶进行传代培养后，加入血清可抑制剩余的蛋白水解酶的活性（参见 8.5.1 节），因为抑制物有抗蛋白酶的作用。所以用无血清培养基进行传代培养时必须在无血清培养基中加入诸如大豆胰蛋白酶抑制剂（Sigma-Aldrich）这类物质。虽然可选择用离心的方法洗涤细胞去除胰蛋白酶，但在洗液中加入胰蛋白酶抑制剂仍然是明智的选择。

胰蛋白酶和其他蛋白酶 用胰蛋白酶处理无血清培养基培养的细胞时，需要特别注意，因为细胞易碎，可能需要降低胰蛋白酶的温度至 4℃以减少对细胞的损伤（McKeehan，1977）。由于粗制胰蛋白酶是由多种蛋白酶组成的复杂的混合物，其中不同的成分需要不同的抑制剂，因而最好用纯的胰蛋白酶。使用异种来源的蛋白酶（参见表 11.1，12.4 节）可以避免动物蛋白来源的物质接触细胞。用重组的胰蛋白酶（TrypLE；TrypZean）可代替纯化的猪胰蛋白酶，非哺乳动物蛋白酶（如 Accutase 或 Accumax，Sigma-Aldrich），植物来源的蛋白酶也可使用，木瓜蛋白酶是源自木瓜的蛋白酶混合物，虽然常用于原代培养时解离细胞，但也已应用于无血清培养（Paul，1975；Young and Levison，1997）。链霉蛋白酶（Sigma-Aldrich）、解离酶、释放酶（Roche）和胶原酶是细菌的蛋白酶，不能用胰蛋白酶抑制剂使其失活，可能需要用离心的方法去除。在无法使酶失活的无血清条件下，可以用稀释的方法使链霉蛋白酶失活（McKeehan，私人通信）。链霉蛋白酶是非常有效的，但对一些细胞有毒性。如果有上皮细胞存在，用解离酶和胶原酶消化时，不能得到单细胞悬液。

9.4.4 激素

用来代替血清的激素包括 50ng/mL 的生长激素（somatotropin，促长素）、1~10U/mL 的胰岛素，它们能增加多种不同类型细胞的贴瓶率；氢化可的松能提高胶质细胞、成纤维细胞的克隆形

成率（表 9.1、表 9.2，见 16.2.1 节），对维持表皮角质细胞和其他一些上皮细胞的生长是必需的（参见 25.2.1 节）。重组的人胰岛素（Life Technologies）、人生长激素（Sigma-Aldrich）及人胰高血糖素样多肽（GLP-1 PeproTech）可购买商品，其他重组肽激素可通过国家激素和多肽项目（NHPP）获得。Barnes 和 Sato（1980）提出 10pmol/L 三碘甲状腺氨酸（T3）是 MDCK（狗肾细胞）无血清培养所必需的补充成分，它也能用于肺上皮细胞（Lechner and LaVeck，1985；Masui et al.，1986b）。不同组合的雌激素、雄激素或孕酮与氢化可的松和催乳素相结合（10nmol/L），对维持乳腺上皮细胞是必不可少的（Klvejer-Anderson and Buehring，1980；Hammond et al.，1984；Strange et al.，1991；Lee et al.，1996）。

通常可用与细胞活性不相关的其他激素来有效地替代血清，如卵泡刺激素（FSH）对 B16 小鼠黑素细胞有作用（Barnes and Sato，1980），铃蟾肽样多肽（胃泌素释放肽，GRP）对支气管上皮细胞（DeMichele et al.，1994）和小细胞肺癌有作用（Hohla et al.，2007）。

9.4.5 生长因子

体内已发现的促有丝分裂的多肽家族已相当多（表 9.4），包括肝素结合生长因子（包括 FGF 家族）、EGF、PDGF（Barnes et al.，1984a，1984c）、IGF-Ⅰ和 IGF-Ⅱ（Conover et al.，1995；Li et al.，2000）及白细胞介素（Smith et al.，2013）等，白细胞介素在 1~10ng/mL 有活性。除了那些最初被证实有活性的组织之外，生长因子和细胞因子还对许多组织有着广泛的特异性（Barnes et al.，1984d）。角质细胞生长因子（KGF）（Aaronson et al.，1991）不仅在表皮角质细胞中表现出活性，而且也可诱导前列腺表皮的增殖和分化（Planz et al.，1998；Thomson et al.，1997）。肝细胞生长因子（HGF）（Kenworthy et al.，1992）对肝细胞有促有丝分裂的作用，也是肾小管形态发生因子（Furue and Saito，1997；Montesaon et al.，1991；Balkovetz and Lipschutz，1999）。生长因子和细胞因子有其特异性是由于它们的产生是局部性的，作用范围是有限的，多数类似于旁分泌因子（作用于邻近的不同细胞），不流入血液而全身分布。

生长因子之间或和其他激素、旁分泌因子（如前列腺素 $F_{2\alpha}$和氢化可的松）之间可起相互协同作用或起加成作用（Westermark and Wasteson，1975；Gospodarowicz，1974）。举个例子：白细胞介素 6（IL-6）和制瘤素 M 对 A549 细胞的作用要依赖于地塞米松——一种人工合成的氢化可的松类似物（McCormick et al.，1995；McCormick and Freshney，2000），这种作用是由于产生了一种肝素硫酸蛋白聚糖（HSPG）（Yevdokimova and Freshney，1997），对肝素或 HSPG 的这种需求是与 FGF（Klagsbrum and Baird，1991）一起被首次发现的，但这可能是一个较普遍的现象，例如，β-多聚糖参与对 TGF-β 的细胞反应（Lopez-Casillas et al.，1993），还有一些生长因子要依赖于另一种生长因子的激活而起作用（Phillips and Christofalo，1988），如单独使用铃蟾肽不能促进正常细胞有丝分裂，而需要胰岛素或一种类胰岛素因子（IGF）同时先行激活（Santiskulvong et al.，2004）。

9.4.6 血清中的营养物质

尽管还缺乏需要微量矿物质的证据，但铁、铜和一些矿物质都已被纳入无血清培养基的配方

表 9.4 生长因子与促有丝分裂原

名称与异名	缩写	分子量（kDa）	来源[a]	功能
酸性成纤维细胞 gf；aFGF；肝素结合 gf1，HBGF-1；内皮细胞 gf（ECGF）；成肌细胞 gf（MGF）	FGF-1	13h	牛脑；垂体	内皮细胞的促有丝分裂原
肌动蛋白，TGF-β 家族		g	生殖腺	成形素；刺激 FSH 分泌物
双调蛋白	AR	19，21，43	MCF-7 适应性培养基	角化细胞的自分泌 EGF 样生长因子
促血管生成素	Ang	16	成纤维细胞，淋巴细胞，结肠上皮细胞；细胞	促血管生成素；内皮细胞有丝分裂原
神经胶质细胞生长因子-1；酸性 FGF 成员	AFG-1	14	大脑	星形神经胶质细胞促有丝分裂原
神经胶质细胞生长因子-2；碱性 FGF 成员	AFG-2	14	大脑	星形神经胶质细胞促有丝分裂原
碱性成纤维细胞 gf；bFGF；HBGF-2：前列腺内皮细胞生长因子	FGF-2	13h	牛脑；垂体	许多中胚层和神经外胚层细胞的促有丝分裂原；促脂肪细胞卵巢颗粒细胞分化
脑来源的神经营养因子	BDNF	28	大脑	神经细胞生存能力
肿瘤坏死因子	TNF-α	17	单核细胞	分解代谢；恶病质；休克
霍乱毒素	CT	80~90	霍乱杆菌	一些正常上皮细胞的促有丝分裂原
睫状体来源的神经营养因子；IL-6 成员	CNTF		眼	
结缔组织生长因子；IGFBP8	CTGF	38p	腹膜间皮；间质细胞	成纤维细胞有丝分裂原；促血管生成素；基质产生
内皮细胞生长因子；酸性 FGF 家族	ECGF	h	重组	促内皮细胞有丝分裂
内皮细胞生长补充剂；内皮细胞促有丝分裂原混合物	ECGS		牛垂体	促内皮细胞有丝分裂
内毒素			细菌	刺激 TNF 产生
表皮生长因子，尿抑胃素	EGF	6	下颌唾液腺（小鼠）人尿；豚鼠前列腺	主动运输；DNA、RNA、蛋白质合成；上皮细胞和成纤维细胞的促有丝分裂原 IGF-1 和 TGF-β 的增效作用
促红细胞生成素	EPO	34~39g	肾的近端肾小球细胞	原始红细胞的增殖和分化
眼来源的生长因子-1；碱性 FGF 成员	EDGF-1	14	眼	
眼来源的生长因子-2；酸性 FGF 成员	EDGF-2	14	眼	

续表

名称与异名	缩写	分子量（kDa）	来源[a]	功能
成纤维细胞 gf-3；癌基因 *int-2* 的产物	FGF-3	14h	乳腺肿瘤	促有丝分裂原；形态成形素；血管因子
成纤维细胞 gf-4；癌基因 *hst/KS3* 的产物	FGF-4	14h	胚胎；肿瘤	促有丝分裂原；形态成形素；血管因子
成纤维细胞 gf-5	FGF-5	14h	成纤维细胞，上皮细胞，肿瘤	促有丝分裂原；形态成形素；血管因子
成纤维细胞 gf-6；癌基因 *hst-2* 的产物	FGF-6	14h	睾丸；心脏；肌肉	成纤维细胞的促有丝分裂作用；形态成形素
成纤维细胞 gf-9	FGF-9	14h	重组	
成纤维细胞 gf-10	FGF-10	14h		滋养层侵入，刺激 uPA 和 PAI-1；肺泡上皮细胞有丝分裂原
粒细胞集落刺激因子；多潜能促血细胞生成素；CFS-β	G-CSF	18~22		原始粒细胞的增殖和分化
粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 CSA；人类 CSF-α	CM-CSF	14~35g		原始粒细胞/巨噬细胞的增殖和分化
肝素结合 EGF 样因子	HB-EGF		重组	
肝细胞 gf，HBGF-8；分散因子	HGF	H	成纤维细胞	上皮细胞形态发生；肝细胞增殖
Herlgulin；erbB2 配基	HRG	70	乳腺癌细胞；重组	乳腺和其他上皮细胞的促有丝分裂原
免疫干扰素；巨噬细胞激活因子（MAF）	IFN-γ	20~25	激活的淋巴细胞	抗病毒；激活巨噬细胞
抑制素；TGF-β 家族		31g	卵巢	形态生成素；抑制 FSH 分泌
胰岛素	Ins	6	胰腺的 β-胰岛细胞	葡萄糖吸收与氧化；氨基酸吸收；糖原生成
胰岛素样 gf1；生长调节素-C；NSILA-1	IGF-1	7.6	肝	软骨硫酸化中生长激素的中介效应；胰岛素样活性
胰岛素样 gf2；大鼠的 MSA	IGF-2	7	BRL-3A 细胞的适应性培养基	软骨硫酸化中生长激素的中介效应；胰岛素样活性
干扰素-α1；白细胞干扰素	IFN-α1	18~20	巨噬细胞	抗病毒；诱导分化；抗癌
干扰素-α2；白细胞干扰素	IFN-α2	18~20	巨噬细胞	抗病毒；诱导分化；抗癌
干扰素-β1；成纤维细胞干扰素	IFN-β1	22~27g	成纤维细胞	抗病毒；诱导分化；抗癌
干扰素-β2；成纤维细胞干扰素；IL-6，BSF-2（亦见 IL-6）	IFN-β2	22~27g	激活的 T 细胞；成纤维细胞；肿瘤细胞	角质细胞分化；PC12 细胞分化（亦见 IL-6）
干扰素 γ；免疫干扰素	IFN-γ		激活的淋巴细胞	抗病毒，巨噬细胞激活因子；转化细胞的抗增殖
白细胞介素-1；淋巴细胞激活因子（LAF）；B 细胞激活因子（BAF）；血生成素-1	IL-1	12~18	激活的巨噬细胞	诱导 IL-2 释放

续表

名称与异名	缩写	分子量（kDa）	来源[a]	功能
白细胞介素-2；T细胞 gf（TCGF）	IL-2	15	CD4＋ve 淋巴细胞（NK）；鼠 LBRM-5A4 和人 Jurkat FHCRC 细胞系	支持激活T细胞的生长；刺激 LAK 细胞
白细胞介素-3；多能集落激活因子；肥大细胞生长因子	IL-3	14~28g	激活的T细胞，WEHI-3b 髓性单核细胞系	粒细胞/巨噬细胞的产生和分化
白细胞介素-4；B-细胞 gf；BCGF-1；BSF-1	IL-4	15~20	激活的 CD4＋ve 淋巴细胞	B细胞生成因子；肥大细胞成熟（有 IL-3）
白细胞介素-5；T-细胞替代因子（TRF）；嗜伊红细胞分化因子（EDF）BCGF-2	IL-5	12~18g	T淋巴细胞	嗜伊红细胞分化；活性B细胞增殖因子
白细胞介素-6；干扰素-β2；B-细胞刺激因子（BSF-2）；肝细胞刺激因子；杂交瘤-浆细胞瘤 gf	IL-6	22~27g	激活的T细胞，巨噬细胞和单核细胞；成纤维细胞；肿瘤细胞	急性时相反应；B细胞分化；角质细胞分化；PC12 细胞分化
白细胞介素-7；造血生长因子；淋巴细胞生长素1	IL-7	15~17g	骨髓基质	前-和祖-B细胞生长因子
白细胞介素-8；单核细胞来源的中性粒细胞趋化因子（MDNCF）；T-细胞趋化因子；中性粒细胞激活蛋白（NAP-1）	IL-8	8~10h	LPS 单核细胞，PHA 淋巴细胞；内皮细胞；IL-1 和 TNF 激活的成纤维细胞和角质细胞	中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和T细胞的趋化因子
白细胞介素-9；人类 P-40；小鼠 T-辅助细胞 gf；肥大细胞增强激活剂（MEA）	IL-9	30~40	CD4＋ve T-细胞；由抗 CD4 抗体刺激的 PHA 或 PMA	T辅助细胞的生长因子，巨核细胞，肥大细胞（有 IL-3）
白细胞介素-10；细胞分裂合成抑制因子（CSIF）	IL-10	20		免疫抑制
白细胞介素-11；脂肪生成抑制因子（AGIF）	IL-11	21		刺激浆细胞瘤增殖和T细胞依赖的产生 Ig 的B细胞的发育
白细胞介素-12；细胞毒性淋巴细胞成熟因子	IL-12	40，35 亚单位		活化的T细胞和 NK 细胞的生长因子；诱导 IFN-γ 产生
角质形成细胞 gf，FGF-7	KGF	14h	成纤维细胞	角质形成细胞的增殖与分化；前列腺上皮细胞的增殖与分化
白血病抵制因子；HILDA；1L-6 组的成员	LIF	24	SCO 细胞	抑制胚胎干细胞分化
脂多糖	LPS	10	革兰氏阳性细菌	淋巴细胞激活
淋巴毒素	TNF-β	20~25	淋巴细胞	肿瘤细胞的细胞毒作用
巨噬细胞炎症蛋白-1α	MIP-1α	10	巨噬细胞	造血干细胞抑制剂

续表

名称与异名	缩写	分子量（kDa）	来源[a]	功能
单核细胞/巨噬细胞集落刺激因子 CSF-1	M-CSF	47~74	B 细胞和 T 细胞，单核细胞，肥大细胞，成纤维细胞	巨噬细胞的祖细胞增殖与分化
苗勒氏抑制因子	MIF		睾丸	苗勒氏管抑制剂；卵巢癌抑制剂
神经 gf，β	βNGF	27	雄性小鼠下颌唾液腺	营养因子；趋化因子；分化因子 外周神经的神经突生长
神经营养因子	NT-3			刺激神经突生长
抑瘤素 M；IL-6 组的成员	OSM	28	激活的 T 细胞和 PMA 处理过的单核细胞	分化诱导剂（有糖皮质激素）； 成纤维细胞的有丝分裂原
植物凝集素	PHA	30	红芸豆（*Phaseolus vulgaris*）	淋巴细胞激活作用
血小板来源的内皮细胞生长因子；类似于胶质细胞抑制素（gliostatin）	PD-ECGF	约 70	血小板，成纤维细胞，平滑肌	血管新生；内皮细胞促有丝分裂原；神经细胞生存能力；抑制神经胶质细胞生长
血小板来源的生长因子	PDGF	30	血小板	中胚层和神经外胚层细胞的促有丝分裂原，创伤修复；EGF 和 ICF-1 的增效剂
豆蔻酸佛波醇乙酸盐；TPA；佛波醇酯	PMA	0.617	巴豆油	肿瘤促进剂；一些上皮细胞和黑素细胞的促有丝分裂原； HL-60 细胞和鳞状上皮的分化因子
美洲商陆促有丝分裂原	PWM		美洲商陆（*Phytolacca americana*）的根	单核细胞激活剂
干细胞因子；肥大细胞生长因子；steel 因子；*c-kit* 配体	SCF	31g	内皮细胞，成纤维细胞，骨髓，支持细胞	促多能造血干细胞的第一次成熟分裂
转铁蛋白	Tfn	78	肝	铁转运；促有丝分裂原
转化生长因子	TGF-α	6		诱导非贴壁生长和丧失接触抑制
转化生长因子（6 种）	TGF-β1-6	23~25 二聚体	血小板	上皮细胞增殖抑制剂；鳞状分化诱导剂
血管内皮生长因子	VEGF		肾	血管生成，血管内皮细胞增殖

a 来源（第 4 列）描述的是可分离出天然产物的最初组织来源，在许多情况下，可用商业化的克隆重组材料来代替天然产物（见补充材料中的附录III）

缩写词（不包括第二列）：gf. 生长因子；g. 糖基化；h. 肝素结合物；HBGF. 肝素结合生长因子；p. 基底膜聚糖结合物

注：本表中的部分资料来自 Barnes 等（1984a）、Lange 等（1991）、Jenkins（1992）及 Smith 等（1997）

中。多数配方中含有硒（Na_2SeO_3），大约 20nmol/L，似乎也含有脂类及脂类前体物，如胆碱、亚油酸、乙醇胺、磷酸乙醇胺等（Robertson and Robertson，1995）。

9.4.7 蛋白质和多聚胺

培养基中含有蛋白质，如牛血清白蛋白（BSA）（0.5~10mg/mL）、组织抽提物等，这些物质常可促进细胞的生长与存活，但加入的组分是不明确的，这就产生了外来物污染试剂的问题。组织抽提物包括牛垂体抽提物可联合用于角化细胞无血清培养基（Hammond et al.，1984），但也可用已知的重组生长因子代替。无脂肪酸的牛血清白蛋白用量是 1~10mg/mL；转铁蛋白 5~300ng/mL，它是转运铁的载体，也有促有丝分裂的作用；现在也可使用重组的转铁蛋白，或以重组的乳铁蛋白代替（两者均来自 Ventria Bioscience）。亚精胺（100~1000nmol/L）（Ramot et al.，2011）和腐胺（Kim et al.，1998；Yamazoe et al.，2006）也已经被使用。

9.4.8 黏度

血清的作用之一是增加培养基的黏度。在搅拌悬浮培养时，培养基的黏度显得尤其重要，因为它有助于使切力降至最低。1.2~30mg/mL 的羧甲基纤维素（CMC）（Telling and Ellsworth，1965；Moreira et al.，1995）、1mg/mL 的聚乙烯（PVP）（Vireque et al.，2009；Rashid et al.，2014）、1mg/mL 的非离子表面活性剂 Pluronic F68（polyoxyethylene 和 polyoxpropylene）（Tharmalingam et al.，2008）及 γ-多聚谷氨酸（Chun et al.，2012）都已用于减少机械损伤。

9.5 无血清培养基的研发

研制针对特殊细胞系或原代培养的无血清培养基主要有两种方法。第一种方法是找到一个相关细胞类型的已知培养基配方，加或不加 10%~20%的透析血清，在某一个血清浓度范围（包括浓度为零），逐一或成组地改变培养基成分，随后用克隆生长实验来显示某种潜在的血清替代物的任何补偿效果，即在替代物存在时减少血清可达到相同的克隆生长率。在最低血清浓度下，确定最佳混合物浓度，它仍将使细胞达到相同的克隆生长率。这种方法最初由 Ham 及其同事（Ham，1984）采用，通常能提供最佳培养条件。如果发现某一组成分对血清的减少起到补充的作用，那就通过单种成分的逐一删除将这一活性成分从中筛选出来，然后寻找其最佳浓度（Ham，1984）。当然，这是一项耗时而繁杂的工作，包括绘制细胞生长的生长曲线，每个阶段作克隆生长分析，找到一种适合新细胞类型的新培养基至少要三年时间。

由于第一种方法耗费时间长，使人们想到了第二种方法：对现有培养基，如 RPMI1640（Carney et al.，1981）或 DMEM 与 Ham's F12 的联合培养基（Barnes and Sato，1980）加以补充，而且将加入成分的种类限制在一个较小的范围内，再在一个限定的血清浓度下确定最佳浓度，这些添加的组分包括：硒、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、氢化可的松、雌激素、三碘甲状腺氨酸、乙醇胺、磷酸乙醇胺、生长因子（如 EGF、FGF、PDGF、VEGF）、前列腺素（PGE_1、PGF_2）和其他有特

殊功能的物质（参见9.4节，表9.4）。对多数细胞而言，硒、转铁蛋白、胰岛素通常都很重要，但对其他成分的需求则差别较大。

9.6 无血清培养基的选择

9.6.1 细胞或产物特异性

如果使用无血清培养基是为了促进一种特殊类型细胞的生长，那么这种选择性是由培养基的选择性决定的，例如，MCDB 153 用于培养表皮角质细胞，LHC-9 用于培养支气管上皮细胞、HITES 用于培养小细胞肺癌细胞、MCDB 130 用于培养内皮细胞等（表9.1、表9.2、表9.5，25.1节）。如果只是为了不用血清培养连续细胞系，如CHO细胞或杂交瘤细胞，从而减少细胞产物中含有滤过性毒素或血清蛋白的可能，那么这种选择的范围就会更广，并有许多商品可供选择（表9.5）。然而，可能有必要筛选不同厂家的商品，以确保：①细胞生长；②产物结构可以保持；③不需要长的适应期；④到货时间和价格可以接受。

当从创建者或知名的细胞库获得一个细胞系的时候，他们会推荐合适的培养基，除非培养基无货或与其他成分不匹配才需更换培养基。可能的话，最好还是用创建者推荐的培养基，因为它可能是确保该细胞系保持其特异性的唯一途径。表9.5总结了部分无血清培养基的适应性，这些无血清培养基已列在表9.1和表9.2中，可供选择时参考（另见Mather，1998；Arota，2013）。

9.6.2 细胞系对无血清培养基的适应性

许多连续细胞系，如HeLa、CHO-K1或小鼠骨髓瘤可能可以适应缺乏血清的生长环境（Xiao et al.，2014）。适应过程常常是一个很长的选择周期，此间只有细胞群体中的少数被选择出来，因此在此选择过程中确保细胞系的性质不丧失是很重要的（Zander and Bemark，2008；Rodrigues et al.，2013）。如果是骨髓瘤细胞，其目的是用于制备杂交瘤；而如果是CHO细胞，则是用于做转染实验，因此用无血清培养基的选择培养必须在融合和转染之前进行，使选择过程中丢失特性的危险性降到最低（Ozturk et al.，2003）。

适应无血清培养基通常要经过几次连续的传代培养，在每次传代时或传代前，或根据适应的程度确定更换频率，使血清浓度逐渐降低。一旦细胞在某一血清浓度条件下形成稳定的增殖状态，就可用更低浓度的血清将细胞传代培养，直至稳定的生长增殖再次形成，而后再次稀释血清。如果是悬浮培养，要计算活细胞的数量，根据活细胞的数量稀释细胞悬液，此时需要保持的最低细胞浓度要比正常传代培养所需的细胞浓度高一些。对于单层细胞培养，可在传代培养的前几天先降低培养基中的血清浓度，而后再用新的低浓度培养基进行传代培养。在适应过程中，可能有必要在培养基中添加一些已知的因子来代替血清（参见9.4节、9.6节）。

对于那些在无血清培养基中生长的增殖细胞，加入血清有可能抑制其生长。生长因子，如TGF-β能够抑制上皮细胞的生长（Masui et al.，1986b），EGF抑制A431细胞的生长（Barnes，1984c）。

表 9.5 无血清培养基的选择

细胞或细胞系	无血清培养基（见表 9.1）	参考文献（另见表 9.1 和表 9.2）	供应商（特定培养基或替代物）
A549	PeproGrow-1		PeproTech
脂肪细胞	前脂肪细胞生长培养基	Rodriguez et al.，2004	PromoCell；Stratech；Zen-Bio
	前脂肪细胞分化培养基		
	脂肪细胞营养培养基		
星形胶质细胞-见神经胶质细胞			
BHK21	HyQ PF CHO；HyG PF CHO MPS；PC-1	Cruz et al.，1998	Lonza；MP Biomedicals
支气管上皮细胞	LHC-9	见方案 25.9-Su	Life Technologies；Lonza；PromoCell
鸡胚成纤维细胞	MCDB201，202	McKeehan and Ham，1976b	Sigma-Aldrich
中国仓鼠卵巢细胞（CHO）	MCDB302，PC-1	Hamilton and Ham，1977	Lonza；Sigma-Aldrich；Life Technologies；PeproTech；PromoCell
软骨细胞	添加组分的 DMEM/F12	Adolphe，1984（见方案 22.16-Su）	PromoCell
连续细胞系	Eagle's MEM，M199，MB752/1，CMRL1066，MCDB 培养基，DMEM：F12+补充物	Waymouth，1984	Lonza；Life Technologies；JRH Biosciences；ICN；Sigma-Aldrich
角膜上皮细胞	MCDB153	Leon et al.，2013（另见方案 25.2-Su）	Life Technologies；Lonza，KGM；Cascade
角膜内皮细胞	人角膜内皮细胞培养无血清培养基；	Sornelli et al.，2010	Celprogen；Life Technologies
	人内皮细胞-SFM		
COS-1，COS-7		Doering et al.，2002	
内皮细胞	MCDB130，MCDB131；EndoGRO-LS；内皮细胞-SFM	Knedler and Ham，1987；Gupta et al.，1997；Hoheisel et al.，1998	Cell Applications；Lonza；Cascade；Life Technologies；Millipore；PAA；PromoCell；Sigma-Aldrich
成纤维细胞	MCDB110，MCDB202，MCDB402	Bettger et al.，1981；Shipley and Ham，1983	Lonza；Cascade；PromoCell；Sigma-Aldrich；Stratech；Zen-Bio
神经胶质细胞	Gbico 星形胶质细胞培养基	Michler-Stucke and Bottenstein，1982	Life Technologies；Lonza
神经胶质瘤细胞	SF12（添加了明确的必需氨基酸及非必需氨基酸的 Ham's F12）	Frame et al.，1980；Freshney，1980	Lonza；Life Technologies
HEK293	HEKTOR；HEK；CDM4；HEK293	Cervera et al.，2013	Cell Culture Services；Hyclone；Millipore-CellGro；PeproTech
HeLa 细胞	Ex-Cell	Blaker et al.，1971；Bertheussen，1993	Life Technologies；Lonza；PeproTech
			Sigma-Aldrich

续表

细胞或细胞系	无血清培养基（见表9.1）	参考文献（另见表9.1和表9.2）	供应商（特定培养基或替代物）
造血细胞	α-MEM；Iscove's	Stanners et al.，1971；Iscove and Melchers，1978	Sigma-Aldrich；Roche Diagnostics
肝细胞	BD Hepato；Hepatozyme；Hepatocyte Growth Medium	Nelson et al.，2013；Lubberstedt et al.，2012	BD Biosciences；Life Technologies；PromoCell
HL-60		Li et al.，1997	Lonza
HT-29		Oh et al.，2001	Lonza
人二倍体成纤维细胞	MCDB110，MCDB202；PC-1	Bettger et al.，1981；Ham，1984	Cascade；Lonza；PromoCell
人白血病细胞和正常白细胞	Iscove's	Cox et al.，2004	Lonza；Hyclone；MP Biomedicals；Life Technologies；Sigma-Aldrich
人肿瘤细胞	HITES；Bottenstein N3	Brower et al.，1986；Carney et al.，1981；Masui et al.，1986b；Bottenstein，1984；Chopra et al.，1996	
肝细胞，肝脏上皮细胞	Williams E，L15	Williams and Gunn，1974；Mitaka et al.，1993	Lonza；Sigma-Aldrich
人ESC	ESGRO；CellGro；StemLine；StemSpan	Amit et al.，2004	Millipore；Clonagen；CellGenix；Sigma-Aldrich；Stem Cell Technologies
杂交瘤	Iscove's；Ultradoma；Ex-Cell	Iscove and Melchers，1978；Wognum and Lee，2013	Atlanta Biologicals；BD Biosciences；Life Technologies；Irvine Scientific；Hyclone；Lonza；Metachem；MP Biomedicals；PromoCell；Roche；Sigma-Aldrich
昆虫细胞	BaculoGrow	Ikonomou et al.，2003	Life Technologies；Sigma-Aldrich；Millipore-CelGro；Oxford Expression Technologies
角质形成细胞	MCDB153	Peehl and Ham，1980；Tsao et al.，1982；Boyce and Ham，1983（见方案25.1-Su）	Life Technologies；Cascade；Cellntech；Lonza；Millipore；PromoCell；Sigma-Aldrich
L细胞（L929，LS）	NCTC109，NCTC135	Birch and Pirt，1970，1971；Higuchi，1977	Sigma-Aldrich
类淋巴母细胞系（人）	Iscove's	Iscove and Melchers，1978	JRH Biosciences；CellGenix；GE Heathcare（Amersham）
乳腺上皮细胞	MCDB170	Hammond et al.，1984（见方案25.3-Su）	Cascade；Lonza；AthenaES
MDCK 狗肾上皮细胞	K-1；PC-1；再加MDCK	Taub，1984；Hu et al.，2011	Cesco Bioengineering；Lonza
LLC-PK，猪肾	K-2	Taub，1984	
黑色素细胞	Gilchrest	Naeyeart et al.，1991（另见方案25.21-Su）	Lonza；Cascade；PromoCell
黑色素瘤细胞	Gilchrest	Halaban，2004（另见方案25.21）	Lonza；Cascade；PromoCell
小鼠胚胎成纤维细胞；3T3细胞	MCDB 402	Shipley and Ham，1983；Ham，1984	Biosource
小鼠ESC	ESGRO；KnockOutDMEM	Nichols and Ying，2006	Life Technologies；Millipore

续表

细胞或细胞系	无血清培养基（见表 9.1）	参考文献（另见表 9.1 和表 9.2）	供应商（特定培养基或替代物）
小鼠红白血病	SF12（添加了明确的必需氨基酸及非必需氨基酸的 Ham's F12），Iscove's	Iscove and Melchers，1978	MP Biomedicals；Life Technologies；Sigma-Aldrich
小鼠骨髓瘤		Wognum and Lee，2013	Sigma-Aldrich；Life Technologies；Peprotech
小鼠成神经细胞瘤	MCDB 411；DMEM：F12/N1	Agy et al.，1981；Bottenstein，1984	
神经细胞	DMEM：F12/N3；B27/Neurobasal；N2	Bottenstein，1984；Brewer，1995	Life Technologies
成骨细胞		Shiga et al.，2003	OGM，Lonza；PromoCell
前列腺	WJAC 404	Peehl，2002（另见表 9.1）	Lonza
肾（另见 HEK-293 和 MDCK）	REGM；MsGM		Lonza
骨骼肌成肌细胞		Goto et al.，1999	PromoCell
平滑肌细胞			Cascade；Lonza；PromoCell
尿路上皮（Urothelium）	MCDB 153；KSFMc；KGM-2	Rossi et al.，2001；Southgate et al.，2002	Lonza
Vero	PFEK-1；PF-Vero；MP-Vero；Ex-cell Vero		Autogen Bioclear；Clonagen；Hyclone；MP Biomedicals；Sigma-Aldrich

注：培养基选择的更多指导参见文献（Mather，1998；Arora 2013）；亦见表 9.1、表 9.2 和附录III

9.7 无血清培养基的制备

现在应用的无血清培养基种类很多，一些厂家（参见补充材料的附录III）可提供针对特殊类型细胞的无血清培养基（参见表9.1、表9.2，25.1节）。制备无血清培养基的操作方法与制备常规培养基的程序大致相同［见10.4.4节；另见（Waymouth，1984）］。配制时要用超纯的试剂和水，小心配制含 Ca^{2+}、Fe^{2+}或 Fe^{3+}的溶液，防止产生沉淀。在碱性pH和有磷酸盐存在的条件下金属盐溶液会产生沉淀，在培养基或盐溶液经过高压灭菌后尤为如此，所以储存液中的阳离子必须保存在低pH的条件下（低于6.5），并且要保证无磷酸盐的存在。溶液要经过高压灭菌或过滤消毒（参见10.5节）。通常推荐的方法是最后或临用培养基之前再加阳离子，或者将各种组分通常配制成一系列的储存液：1000×的矿物质和维生素；50×的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸溶解于0.1mol/L HCl中；100×的必需氨基酸溶解于水中；10×的盐溶解于水中；还有其他的特殊辅助因子，如脂类，用适当的溶剂配制成1000×溶液。这些成分要按照正确的比例配制并稀释到最终的浓度，然后检测pH和渗透压（参见10.6节）。

最好在使用培养基之前再分别加入生长因子、激素和细胞黏附因子，因为可能需要将它们调整至适合于特定的实验条件。

9.8 无动物蛋白培养基

某些管理委员会不断地施加压力，要求在生物制药的生产过程中使培养的细胞不接触动物蛋白。重组胰蛋白酶或一种无脊椎动物的水解酶可以代替天然胰蛋白酶（参见9.4.3节、12.5节），重组生长因子可以代替天然的生长因子。白蛋白可以使用人重组白蛋白（Sigma-Alrdich），但是通过添加一些因子，如脂类、激素、矿物质和生长因子等，常常可以代替白蛋白（参见9.4.4节、9.4.5节），通常在血清中这些物质结合于白蛋白，而白蛋白本身是否具有一定的作用尚需进一步明确。转铁蛋白、胰岛素及其他许多肽类激素和生长因子都可使用重组蛋白产品（参见9.4节）。要适用于无蛋白培养基可能还要经过进一步选择，必须进行规范的检测以保证良好的生长及产物结构的正确性或保持正确的表型。大多数无血清培养基的供应商也可提供无动物蛋白的培养基。

作为一种选用的策略，可能可以先在无血清培养基甚至含血清培养基中扩大细胞量，当细胞达到高密度时，再转换使用无动物蛋白培养基，如在中空纤维灌流系统（如FiberCell）中进行。这样做可以获得细胞表型和产物结构的正确表达，在细胞增殖的情况下表达作用得到增强。然而，如果细胞产物是用于生物制药，就必须做到永不接触动物蛋白。

9.9 小　　结

尽管无血清培养条件可能很理想，但还是不可否认保留血清的做法要相对简单；使用一些无血清培养基需要特殊的技术；要研制一种新的配方甚至只是调整现有的配方都需要耗费大量的时间、精力和财力；对于多数实验室而言，如果细胞类型有多种，要采用无血清培养，就会因为培

养基的多样性而带来许多麻烦。但有一点是毫无疑问的，探索调控细胞生长和分化的过程需要一个稳定和明确的条件、生物技术的发展要求产品的纯化更加容易、所有潜在的污染源需要消除，所有这些需求最终将促使无血清培养基在各个领域得到广泛的应用。

参考文献

Aaronson SA, Bottaro DP, Miki T, Ron D, Finch PW, Fleming TP, Ahn J, Taylor WG, Rubin JS (1991). Keratinocyte growth factor: A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. *Ann. NY Acad. Sci.* **638**:62–77.

Adolphe M (1984). Multiplication and type II collagen production by rabbit articular chondrocytes cultivated in a defined medium. *Exp. Cell. Res.* **155**:527–536.

Agy PC, Shipley GD, Ham RG (1981). Protein-free medium for mouse neuroblastoma cells. *In Vitro* **17**:671–680.

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **70**(3):837−845.

Arora M (2013). Cell culture media: A review. *Mater. Methods* **3**:175 (http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175).

Balkovetz DF, Lipschutz JH (1999). Hepatocyte growth factor and the kidney: It is not just for the liver. *Int. Rev. Cytol.* **186**:225–260.

Barnes DW (1984). Growth characteristics of A431 human epidermoid carcinoma cells in serum-free medium: inhibition by epidermal growth factor. *Adv. Exp. Med. Biol.* **172**:49-66.

Barnes D, Sato G (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **102**:255–270.

Barnes WD, Sirbasku DA, Sato GH (eds.) (1984a). *Cell culture methods for molecular and cell biology; Vol. 1: Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal cell culture.* New York: Alan R. Liss.

Barnes WD, Sirbasku DA, Sato GH (eds.). (1984b). *Cell culture methods for molecular and cell biology; Vol. 2: Methods for serum-free culture of cells of the endocrine system.* New York: Alan R. Liss.

Barnes WD, Sirbasku DA, Sato GH (eds.). (1984c). *Cell culture methods for molecular and cell biology; Vol. 3: Methods for serum-free culture of epithelial and fibroblastic cells.* New York: Alan R. Liss.

Barnes WD, Sirbasku DA, Sato GH (eds.). (1984d). *Cell culture methods for molecular and cell biology; Vol. 4: Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells.* New York: Alan R. Liss.

Benders AAGM, van Kuppevelt THMSM, Oosterhof A, Veerkamp JH (1991). The biochemical and structural maturation of human skeletal muscle cells in culture: The effect of serum substitute, Ultroser. *G. Exp. Cell Res.* **195**:284–294.

Bertheussen, K. (1993). Growth of cells in a new defined protein-free medium. *Cytotechnology* **11**:219–231.

Bettger WJ, Boyce ST, Walthall BJ, Ham RG (1981). Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with EGF, insulin and dexamethasone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:5588–5592.

Birch JR, Pirt SJ (1970). Improvements in a chemically-defined medium for the growth of mouse cells (strain LS) in suspension. *J. Cell Sci.* **7**:661–670.

Birch JR, Pirt SJ (1971). The quantitative glucose and mineral nutrient requirements of mouse LS (suspension) cells in chemically-defined medium. *J. Cell Sci.* **8**:693–700.

Blaker GJ, Birch JR, Pirt SJ (1971). The glucose, insulin and glutamine requirements of suspension cultures of HeLa cells in a defined culture medium. *J. Cell Sci.* **9**:529–537.

Bottenstein JE (1984). Culture methods for growth of neuronal cells lines in defined media. In BarnesDW, SirbaskuDA, SatoGH (eds.), *Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells.* New York: Alan R. Liss, pp. 3−13.

Boyce ST, Ham RG (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**:33s–40s.

Brower M, Carney DN, Oie HK, Gazdar AF, Minna JD (1986). Growth of cell lines and clinical specimens of human nonsmall cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.* **46**:798–806.

Carney DN, Bunn PA, Gazdar AF, Pagan JA, Minna JD (1981). Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3185–3189.

Cartwright T, Shah GP (1994). Culture media. In DavisJM (ed.), *Basic cell culture, a practical approach.* Oxford, UK: IRL Press at Oxford University Press, pp. 58–91.

Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM (2013). Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol.* **166**:152−165.

Chopra DP, Xue-Hu IC (1993). Secretion of alpha-amylase in human parotid gland epithelial cell culture. *J. Cell Physiol.* **155**:223−233.

Chopra DP, Grignon DJ, Joiakim A, Mathieu PA, Mohamed A, Sakr WA, Powell IJ, Sarkar FH (1996). Differential growth factor responses of epithelial cell cultures derived from normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and primary prostate carcinoma. *J. Cell Physiol.* **169**:269–280.

Chowdhury SR, Aminuddin BS, Ruszymah BH (2012). Effect of supplementation of dermal fibroblasts conditioned medium on expansion of keratinocytes through enhancing attachment. *Indian J. Exp. Biol.* **50**:332−339.

Chun BH, Lee YK, Chung N (2012). Poly-γ-glutamic acid enhances the growth and viability of Chinese hamster ovary cells in serum-free medium. *Biotechnol. Lett.* **34**:1807−1810.

Conover CA, Hintz RL Johnston BF (1995). Differential effects of glucocorticoids on insulin-like growth factor 1 action in cultured human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **163**:615−622.

Cox CV, Evely RS, Oakhill A, Pamphilon DH, Goulden NJ, Blair A. (2004). Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* **104**(9):2919−2925.

Cruz HJ, Moreira JL, Stacey G, Dias EM, Hayes K, Looby D, Griffiths B, Carrondo MJ (1998). Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum-free media and protein-free medium. *Cytotechnology* **26**(1):59−64.

DeMichele MA, Davis AL, Hunt JD, Landreneau RJ, Siegfried JM (1994). Expression of mRNA for three bombesin receptor subtypes in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**:66−74.

Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P (2002). High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* **277**:38345−38349.

Evans VJ, Bryant JC (1965). Advances in tissue culture at the National Cancer Institute in the United States of America. In RamakrishnanCV (ed.), *Tissue culture.* The Hague: Junk, pp. 145–167.

Evans VJ, Bryant JC, Fioramonti MC, McQuilkin WT, Sanford KK, Earle WR (1956). Studies of nutrient media for tissue C cells in vitro; I: A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. *Cancer Res.* **16**:77.

Frame M, Freshney RI, Shaw R, Graham DI (1980). Markers of differentiation in glial cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **4**:732.

Freshney RI (1980). Culture of glioma of the brain. In ThomasDGT, GrahamDI (eds.), *Brain tumours: Scientific basic, clinical investigation and current therapy*. London: Butterworths, pp. 21–50.

Froud SJ (1999). The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* **99**:157–166.

Fu B, Quintero J, Baker CC (2003). Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes. *Cancer Res*, **63**(22):7815−7824.

Furue M, Saito S (1997). Synergistic effect of hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor-1 on the branching morphogenesis of rat submandibular gland epithelial cells. *Tissue Cult. Res. Commun.* **16**:189–194.

Gospodarowicz D (1974). Localization of fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**:123–127.

Goto S, Miyazaki K, Funabiki T, Yasumitsu H (1999). Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Anal. Biochem.* **272**:135–142.

Gottipamula S, Ashwin KM, Muttigi MS, Kannan S, Kolkundkar U, Seetharam RN (2014). Isolation, expansion and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Cell Tissue Res.*

Guner M, Freshney RI, Morgan D, Freshney MG, Thomas DGT, Graham DI (1977). Effects of dexamethasone and betamethasone on in vitro cultures from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **35**:439–447.

Gupta K, Ramakrishnan S, Browne PV, Solovey A, Hebbel RP (1997). A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented conditions: Isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor. *Exp. Cell Res.* **230**:244–251.

Halaban R (2004). Culture of melanocytes from normal, benign, and malignant lesions. In PfragnerR, FreshneyRI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 289–318.

Ham RG (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell Res.* **29**:515.

Ham RG (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**:288.

Ham RG (1984). Growth of human fibroblasts in serum-free media. In BarnesDW, SirbaskuDA, SatoGH (eds.), *Cell culture methods for molecular and cell biology*, Vol. 3. New York: Alan R. Liss, pp. 249–264.

Ham RG, McKeehan WL (1978). Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro* **14**:11–22.

Hamilton WG, Ham RG (1977). Clonal growth of Chinese hamster cell lines in protein-free media. *In Vitro* **13**:537–547.

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR (1984). Serum free growth of human mammary epithelial cells: Rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5435–5439.

Higuchi K (1977). Cultivation of mammalian cell lines in serum-free chemically defined medium. *Methods Cell. Biol.* **14**:131.

Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:312–315.

Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, Buchholz S, Baker B, Kannadka C, Moder A, Aigner E, Datz C, Halmos G (2007). Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:18671−18676.

Hu AY, Tseng YF, Weng TC, Liao CC, Wu J, Chou AH, Chao HJ, Gu A, Chen J, Lin SC, Hsiao CH, Wu SC, Chong P (2011). Production of inactivated influenza H5N1 vaccines from MDCK cells in serum-free medium. *PLoS ONE* **6**(1):e14578.

Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:1–20.

Iscove N, Melchers F (1978). Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **147**:923–933.

Jeon S, Choi SH, Wolosin JM, Chung SH, Joo CK (2013). Regeneration of the corneal epithelium with conjunctival epithelial equivalents generated in serum- and feeder-cell-free media. *Mol. Vision* **19**:2542−2550.

Kandel J, Lee HS, Sobolewski P, Tomczyk N, Composto RJ, Eckmann DM (2014). Chemically grafted fibronectin for use in QCM-D cell studies. *Biosens. Bioelectron.* **58C**:249−257.

Keen MJ, Rapson NT (1995). Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* **17**:153–163.

Kenworthy P, Dowrick P, Baillie-Johnson H, McCann B, Tsubouchi H, Arakaki N., Daikuhara Y, Warn RM (1992). The presence of scatter factor in patients with metastatic spread to the pleura. *Br. J. Cancer* **66**:243–247.

Kim EJ, Kim NS, Lee GM (1998). Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **34**:757−761.

Klagsbrun M, Baird A (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* **67**:229–231.

Klevjer-Anderson P, Buehring GC (1980). Effect of hormones on growth rates of malignant and nonmalignant human mammary epithelia in cell culture. *In Vitro* **16**:491–501.

Knedler A, Ham RG (1987). Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. *In Vitro* **23**(7):481–491.

Lechner JF, LaVeck MA (1985). A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods* **9**:43–48.

Lee TH, Baik MG, Im WB, Lee CS, Han YM, Kim SJ, Lee KK, Choi YJ (1996). Effects of EHS matrix on expression of transgenes in HC11 cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **32**:454–456.

Levy AF, Zayats M, Guerrero-Cazares H, Quiñones-Hinojosa A, Searson PC (2014). Influence of basement membrane proteins and endothelial cell-derived factors on the morphology of human fetal-derived astrocytes in 2D. *PLoS ONE* **9**(3):e92165.

Li D, Hettle S, McLean J, Macdonald C. (2000). Survival of 3T3 cells expressing or co-expressing bFGF and/or IGF-I and/or IGF-II in low serum and serum free media. *Cytotechnology* **32**:209−218.

Lopez-Casillas F, Wrana J. L, Massague J (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF-β signalling receptor. *Cell* **73**:1435–1444.

Lübberstedt M1, Müller-Vieira U, Biemel KM, Darnell M, Hoffmann SA, Knöspel F, Wönne EC, Knobeloch D, Nüssler AK, Gerlach JC, Andersson TB, Zeilinger K (2012). Serum-free culture of primary human hepatocytes in a miniaturized hollow-fibre membrane bioreactor for pharmacological in vitro studies. *J Tissue Eng. Regen. Med.*

Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC (1986a). Type beta transforming growth factor is the primary

differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2438–2442.

Masui T, Lechner JF, Yoakum GH, Willey JC, Harris CC (1986b). Growth and differentiation of normal and transformed human bronchial epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **4**(suppl.):73–81.

Mather JP (1998). Making informed choices: Medium, serum, and serum-free medium; how to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create. *Methods Cell Biol.* **57**:19–30.

Mather JP, Sato GH (1979a). The growth of mouse melanoma cells in hormone supplemented, serum-free medium. *Exp. Cell Res.* **120**:191.

Mather JP, Sato GH (1979b). The use of hormone supplemented serum-free media in primary cultures. *Exp. Cell Res.* **124**:215.

McCormick C, Freshney RI (2000). Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **82**:881–890.

McCormick C, Freshney RI, Speirs V (1995). Activity of interferon alpha, interleukin 6 and insulin in the regulation of differentiation in A549 alveolar carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **71**:232–239.

McKeehan WL (1977). The effect of temperature during trypsin treatment on viability and multiplication potential of single normal human and chicken fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **1**:335–343.

McKeehan WL, Ham RG (1976a). Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* **71**:727–734.

McKeehan WL, Ham RG (1976b). Methods for reducing the serum requirement of growth *in vitro* of non-transformed diploid fibroblasts. *Dev. Biol. Stand.* **37**:97–98.

McKeehan WL, Adams PS, Rosser MP (1984). Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free primary cell culture. *Cancer Res.* **44**:1998–2010.

McLean JS, Frame MC, Freshney RI, Vaughan PFT, Mackie AE. (1986). Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res.* **6**:1101–1106.

Merten OW (1999). Safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* **99**:167–180.

Michler-Stuke A, Bottenstein J (1982). Proliferation of glial-derived cells in defined media. *J. Neurosci. Res.* **7**:215–228.

Mitaka T, Norioka K-I, Mochizuki Y (1993). Redifferentiation of proliferated rat hepatocytes cultures in L15 medium supplemented with EGF and DMSO. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**:714–722.

Montesano R, Matsumonto K, Nakamura T, Orci L (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**:901–908.

Moreira JL, Santana PC, Feliciano AS, Cruz PE, Racher AJ, Griffiths JB, Carrondo MJ (1995). Effect of viscosity upon hydrodynamically controlled natural aggregates of animal cells grown in stirred vessels. *Biotechnol. Progress* **11**:575–583.

Morgan JG, Morton HJ, Parker RC (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture; I: Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**:1.

Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park H-Y, Gilchrest BA (1991). Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol.* **125**:297–303.

Nelson LJ, Treskes P, Howie AF, Walker SW, Hayes PC, Plevris JN (2013). Profiling the impact of medium formulation on morphology and functionality of primary hepatocytes in vitro. *Sci. Rep.* **3**:2735.

Nichols J, Ying QL (2006). Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum- and feeder-free culture. *Methods Mol. Biol.* **329**:91–98.

Ozturk S, Kaseko G, Mahaworasilpa T, Coster HG (2003). Adaptation of cell lines to serum-free culture medium. *Hybrid. Hybridomics* **22**:267–272.

Parker RC, Castor LN, McCulloch EA (1957). Altered cell strains in continuous culture. Special publication. *NY Acad. Sci.* **5**:303.

Paul J (1975). *Cell and tissue culture.* Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 220–2211.

Peehl DM (2002). Human prostatic epithelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelialcCells*, 2 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 171–194.

Peehl DM, Ham RG (1980). Clonal growth of human keratinocytes with small amounts of dialysed serum. *In Vitro* **16**:526–540.

Pfeifer AM, Lechner JF, Masui T, Reddel RR, Mark GE, Harris CC (1989). Control of growth and squamous differentiation in normal human bronchial epithelial cells by chemical and biological modifiers and transferred genes. *Environ. Health Perspect.* **80**:209–220.

Phillips PD, Christofalo VJ (1988). Classification system based on the functional equivalency of mitogens that regulate WI-38 cell proliferation. *Exp. Cell Res.* **175**:396–403.

Planz B, Wang Q, Kirley SD, Lin CW, McDougal WS (1998). Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: Regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *J. Urol.* **160**:1850–1855.

Ramot Y, Tiede S, Bíró T, Abu Bakar MH, Sugawara K, Philpott MP, Harrison W, Pietilä M, Paus R (2011). Spermidine promotes human hair growth and is a novel modulator of human epithelial stem cell functions. *PLoS ONE* **6**(7):e22564..

Rashid R, Lim NS, Chee SM, Png SN, Wohland T, Raghunath M. (2014). Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation. *Tissue Eng. Part C Methods*

Robertson KM, Robertson CN (1995). Isolation and growth of human primary prostate epithelial cultures. *Methods Cell Sci.* **17**:177–185.

Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Cunnah P, Melton DW, Azeredo J, Oliveira R (2013). Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**:1279–1291.

Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**:255–263.

Rossi MR, Masters JR, Park S, Todd JH, Garrett SH, Sens MA, Somji S, Nath J, Sens DA (2001). The immortalized UROtsa cell line as a potential cell culture model of human urothelium. *Environ Health Perspect.* **109**:801–808.

Santiskulvong C, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2004). Insulin reduces the requirement for EGFR transactivation in bombesin-induced DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**:826–832.

SEFREC (serum-free cell lines) (2014). Interactive database about serum free medias and cell lines (www.sefrec.com).

Shah G (1999). Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals? *Dev. Biol. Stand.* **99**:17–22.

Shiga M, Kapila YL, Zhang Q, Hayami T, Kapila S (2003). Ascorbic acid induces collagenase-1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: Potential association between collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **18**:67–77.

Shipley GD, Ham RG (1983). Multiplication of Swiss 3T3 cells in a serum-free medium. *Exp. Cell Res.* **146**:249–260.

Smith AO, Bowers SL, Stratman AN, Davis GE (2013). Hematopoietic stem cell cytokines and fibroblast growth factor-2 stimulate human endothelial cell-pericyte tube co-assembly in 3D

fibrin matrices under serum-free defined conditions. *PLoS ONE* **8**(12):e85147.

Sornelli F, Lambiase A, Mantelli F, Aloe L (2010). NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells. *Mol. Vision* **16**:1439–1447.

Southgate J, Masters JWR, Trejdosiewicz LK (2002). In FreshneyRI, FreshneyMG (eds), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, pp. 383–399.

Stanners CP, Eliceri GL, Green H (1971). Two types of ribosome in mouse–hamster hybrid cells. *Nat. New Biol.* **230**:52–54.

Strange R, Li F, Fris RR, Reichmann E, Haenni B, Burri PH (1991). Mammary epithelial differentiation in vitro: Minimum requirements for a functional response to hormonal stimulation. *Cell Growth Differ.* **2**:549–559.

Sundqvist K, Liu Y, Arvidson K, Ormstad K, Nilsson L, Toftgård R, Grafström RC (1991). Growth regulation of serum-free cultures of epithelial cells from normal human buccal mucosa. In vitro *Cell Dev. Biol.* **27A**:562–568.

Taub M (1984). Growth of primary and established kidney cell cultures in serum-free media. In BarnesDW, SirbaskuDA, SatoGH (eds.), *Methods for serum-free culture of epithelial and fibroblastic cells.* New York: Alan R. Liss, pp. 3–24.

Telling RC, Ellsworth R (1965). Submerged culture of hamster kidney cells in a stainless steel vessel. *Biotechnol. Bioeng.* **7**:417–434.

Tharmalingam T, Ghebeh H, Wuerz T, Butler M (2008). Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Mol. Biotechnol.* **39**:167–177.

Thomson AA, Foster BA, Cunha GR (1997). Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* **124**:2431–2439.

Trypsin inhibitor (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t7659?lang=en&region=GB).

Tsao MC, Walthall BI, Ham RG (1982). Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell Physiol.* **110**:219–229.

Vireque AA, Camargo LS, Serapião RV, Rosa E Silva AA, Watanabe YF, Ferreira EM, Navarro PA, Martins WP, Ferriani RA (2009). Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology* **71**(4):620–627.

Vonen B, Bertheussen K, Giaever AK, Florholmen J, Burhol PG (1992). Effect of a new synthetic serum replacement on insulin and somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets in long term culture. *J. Tissue Cult. Methods* **14**:45–50.

Waymouth C (1959). Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB752/1). *J. Natl. Cancer Inst.* **22**:1003.

Waymouth C (1984). Preparation and use of serum-free culture media. In BarnesWD, SirbaskuDA, SatoGH (eds.), *Cell culture methods for molecular and cell biology; Vol. 1: Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal cell culture.* New York: Alan R. Liss, pp. 23–68.

Westermark B, Wasteson A (1975). The response of cultured human normal glial cells to growth factors. *Adv. Metab. Disord.* **8**:85–100.

Williams GM, Gunn JM (1974). Long-term cell culture of adult rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **89**:139–142.

Wognum B, Lee T (2013). Simultaneous cloning and selection of hybridomas and transfected cell lines in semisolid media. *Methods Mol. Biol.* **946**:133–149.

Xiao Z, Sabourin M, Piras G, Gorfien SF (2014). Screening and optimization of chemically defined media and feeds with integrated and statistical approaches. *Methods Mol. Biol.* **1104**:117–135.

Yamazoe H, Kobori M, Murakami Y, Yano K, Satoh M, Mizuseki K, Sasai Y, Iwata H (2006). One-step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B12 and heparin. *Cell Transplant.* **15**(2):135–145.

Yevdokimova N, Freshney RI (1997). Activation of paracrine growth factors by heparan sulphate induced by glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **76**:261–289.

Young GM, Levison SW (1997). An improved method for propagating oligodendrocyte progenitors in vitro. *J. Neurosci. Methods* **77**:163–168.

Zander L, Bemark M (2008). Identification of genes deregulated during serum-free medium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. *Cell Prolif.* **41**:136–155.

（陈实平　译）

第 10 章

准备与灭菌

在组织培养的早期，大多数培养基均是在自己的实验室配制，这是组织培养所需的技术支持中重要的组成部分。此外，细胞通常培养于“医用偏平瓶（medical flats）”或专门设计的瓶子（如 Roux flask 或 T-flask）（Earle and Highhouse，1954），细胞生长于玻璃介质上，这些瓶子需要仔细清洗和灭菌。商业制备培养基及塑料培养瓶（常称为 T-flask，或 T25、T75 等，Earle 在 1947 年为玻璃培养瓶引用了这个术语）的引入省去了以往所需的大量准备时间，从而转变了组织培养技术。于是，进入这个领域的大多数人都不再需要自己准备培养基或培养器皿。然而，有些大型企业仍然需要配制自己的培养基，而有些小的实验室可能需要准备特殊的培养基、试剂，或培养器皿。此外，对于那些使用无菌培养基和塑料培养瓶的人们，了解一些如何准备这些物品的背景知识也是很重要的。

10.1　准备试剂与用品

用于组织培养的所有化学试剂与玻璃器皿都有其各自的保存方法。微量的重金属和其他有毒物质很难去除，只有在培养物逐渐衰退时才可能察觉出它们的影响，这说明要用不同的物质清洗不同的玻璃器皿。尽管器皿的沾污程度可能很低，但用于组织培养的玻璃器皿的清洁要求要高于普通玻璃器皿，因此要使用特殊的清洁剂（参见 10.3.4 节）并避免与保存化学物质的一般性实验室玻璃器皿之间的交叉混合使用。现在多数实验室几乎都使用一次性的塑料培养瓶培养细胞，已解决了以玻璃瓶作为培养器皿的清洁问题，然而，每当使用玻璃器皿时（或是用于储存，或是用于培养），化学物质污染培养基或试剂的问题仍然存在，彻底的清洁还是非常必要的。有些去污剂会在瓶子表面留下很强的负离子，所以如果细胞要在这种表面上培养就要用酸来清洗。

10.2　设备与液体的灭菌

所有培养过程中接触到的设备和液体都要进行灭菌，灭菌方法的选择主要取决于物品在高温下的稳定性（表 10.1）。通常情况下，如果物品可抗高温，如金属、玻璃、耐热的塑料（如 PTFE），最好采用干热灭菌，稳定的液体采用蒸汽灭菌，热敏感的塑料制品要用射线或乙醇处理，热不稳

定的液体通常使用过滤灭菌。

表 10.1 灭菌方法

方法	条件	材料	局限性
干热	160℃（320℉），1~2h	热稳定的物质：金属、玻璃、PTFE	可能出现焦化，如显示胶带、棉花塞
湿热	121℃（250℉），15~20min	热稳定的液体，如水、盐溶液、可高温高压灭菌的培养基；适度热稳定的塑料，如硅树脂、聚碳酸酯、尼龙、聚丙烯	需要蒸汽渗透 用蒸汽可渗透的包装，灭菌完成后要有一个干燥循环；大容量液体需要加热的时间
射线			
γ 射线	25kGy	塑料、有机玻璃架子、热敏感的试剂和药物	会出现塑料的化学改变、可能出现微小分子的降解
电子束	25kGy	塑料、有机玻璃架子、热敏感的试剂和药物	需要高能量来源，不适合一般的实验室装置
微波	最大功率 5min	水溶液和胶，如琼脂	只对小体积有效，通常只用于融化琼脂
短波-UV	254nmol/L，50~100W，30min	地面，循环空气	不能到达隐蔽部位，不能杀死孢子
化学方法			
乙烯氧	1h	热稳定的塑料	被灭菌的物品在灭菌之后必须通风 24~48h，释放毒性残留
次氯酸	300~2500ppm，30min	污染的溶液、塑料	需要充分洗涤，可能有残留
70%乙醇	浸泡 1h	解剖器械（可结合烧灼手段）、某些塑料	不能杀死孢子，有机玻璃或透明合成树脂如果浸泡在乙醇中会被破坏
过滤	0.1~0.2μm 孔径的滤膜	所有水溶液；尤其适合不耐热的试剂和培养基。特殊的低蛋白结合滤膜可用于生长因子等物质的过滤	不适合一些有机溶剂，如 DMSO。过滤黏性溶液要慢一些

10.2.1 干热灭菌

这是最简单有效的方法之一，这种方法可以使所放置物品的所有部位在灭菌过程中都达到正确的温度。这需要监测，将温度探头放在物品的中央，置于灭菌物品的一个副本中（参见图 4.17b）。温度必须保持在 160℃（320℉）至少 1h，所以干热灭菌仅限用于玻璃制品、金属制品及抗热的塑料制品，如聚碳酸酯和 PTFE。纸和无菌指示胶带可能会焦糊，产生挥发性产物，最好避免，使用非挥发性指示器更好，如 Brown's 试管（Steris）。

10.2.2 压力-蒸汽灭菌

利用加压蒸汽灭菌（或称湿热灭菌）也是一种高效的方法，可应用于热稳定的液体，如水、盐溶液或一些特殊配方的培养基，需要在 121℃至少放置 20min（图 10.1）。如果在密闭的容器中进行，如硼硅酸盐玻璃（如 Pyrex），就不会有蒸发，但瓶子有爆炸的危险，所以通常要将瓶盖拧松，在完成了包含必要的冷却周期的灭菌程序后，再将盖子拧紧。蒸发量需要监测，如果必须保证物品使用时处于无菌的环境，就要使用无菌的超纯水（UPW）补充。高压锅中应使用蒸馏水、去离子水，或反向渗透水［半纯化水（SPW）］以减少来自高压锅凝结水的污染。

对于干燥的物品，如试管、棉签，或工具，为了达到产生有效灭菌的正确温度和湿度，蒸汽渗透入包装是极其重要的（图 10.1）。这包括高压仓内的前排空或在开始灭菌之前用蒸汽吹扫仓

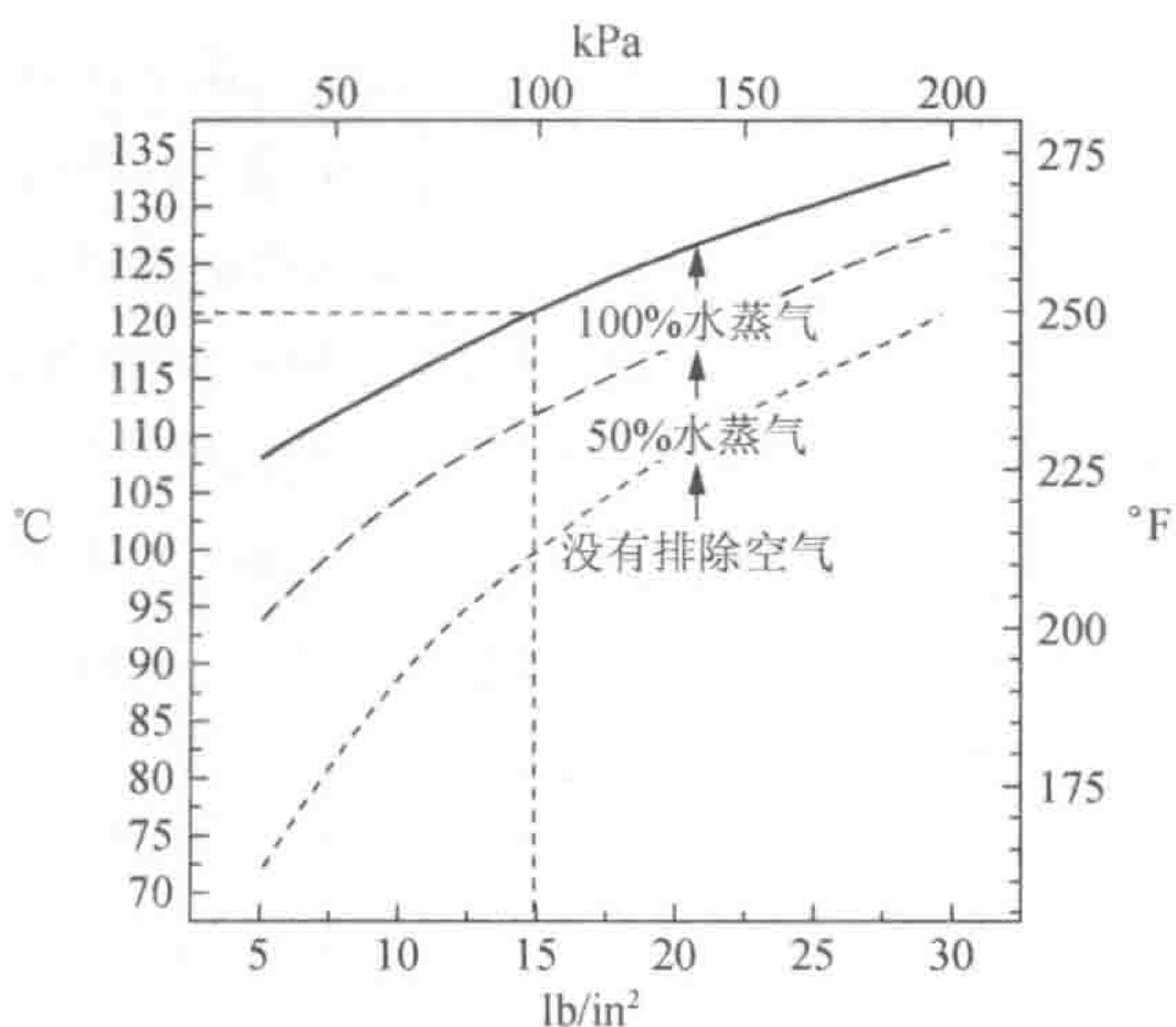


图 10.1 灭菌锅中湿度对温度的影响。上方的曲线表明，只有在所有空气都被排除的条件下，在压力 100kPa（15lb/in²）时，温度才能达到 121℃。即使是排除了 50%的空气，也需要在压力 150kPa（23lb/in²）时，温度才能达到 121℃（数据来自 Breach，1968）

内，因为蒸汽渗透是必需的，湿热灭菌后的无菌物品是湿的，需要干燥。如果是使用简单的灭菌锅或高压锅，就必须将消毒的物品放在烘箱或干燥架中。然而，大多数自动灭菌锅都有后排空（postvac）程序，能够使灭菌的物品在灭菌过程完成后是干燥的。显然，液体的灭菌不需要前排空和后排空，因为没有必要，还会使蒸发显著升高。

10.2.3 射线灭菌

放射线（如 γ 射线，通常是 ^{60}Co 或 ^{135}Cs）可用于消毒不耐热的物品，如塑料或热不稳定液体。由于需要相当高的剂量（25kGy），一般要在中心设备中进行，它也能提供电子波灭菌。物品必须包装和密封，可使用聚乙烯包装，用热焊密封。

10.2.4 化学灭菌

许多塑料器皿不能高压灭菌或干热灭菌，因为温度太高。这类器皿灭菌时，要先在 70%乙醇中浸泡 30min，然后放在层流洁净台内，在紫外线灯照射下晾干。在处理一些塑料器皿（如树脂玻璃、塑胶玻璃、透明合成树脂）时要特别小心，因为它们在乙醇中或暴露在紫外线灯下会解聚。乙烯氧化物可用于塑料器皿的灭菌，但是灭菌后需要 2~3 周才能将其从塑料表面全部清洗掉。还可使用其他化学灭菌剂，包括次氯酸钠和氯仿，但它们更多是作为消除污染的试剂（参见 6.8.6 节）而用于液体和塑料物品的灭菌。氯仿尤其难去除，通常仅用于熏蒸（参见 6.8.7 节），而次氯酸盐可用无菌水有效去除，这取决于所使用产品的配方。

10.2.5 无菌指示器

无菌检测有 3 种需求：①表明物品已经过灭菌程序；②证明物品已经历了所要求的温度、压

力、湿度的处理；③确保无菌。针对第一项需求，通常使用灭菌显示胶带或标签，然而这些标识只能表明物品已经经历了灭菌过程，并不能证明它就是无菌的。这些指示器的主要功能是可以区分待消毒物品与已消毒物品。如果细心选择，第二种类型的指示器将表明物品已经历了正确的灭菌过程。Browne's 试管（Steris）或类似物，可以在灭菌温度达到适当的时间后发生颜色的改变，而其他指示器（如 Thermalog）可以显示灭菌过程是在正确的温度、湿度下经历了正确的时间（图 10.3）。然而，只有用细菌芽孢的杀菌测试条（Mesa Laboratories）才能证实灭菌条件是正确的，因为杀死了芽孢达到了无菌。芽孢试纸条（Mesa Laboratories）也用于一些工业及临床设施、工艺或设备的研发，但通常不用于学术或研究环境，此时第一种和第二种指示器结合使用就足够了。

然而，这些指示器都不能反映真实的结果，除非将它们置于设备中，一个最难灭菌的部位，即塞满了物品的灭菌锅的中央，这个位置就是放置记录式温度计探头的位置（参见图 4.23b）。也可根据灭菌锅内水的温度来判断温度，但这不能准确反映灭菌器内部当时的温度。记录型温度计的优点是可以得到并保存长期的温度记录，可以是数字式存档也可以纸质复制存档。另外，指示器（如 Thermalog）提供了可视的温度和湿度，并且可同时监测样品的多个部分，实际操作时二者均可用（另见图 10.3）。

10.2.6 过滤除菌

不耐热的液体可采用微孔过滤器除菌（参见 10.5.2 节）。有正压过滤法，所用的滤器大小不同：有 13-mm 注射器顶端式滤器，有总直径小于等于 293mm 的连线式多碟滤器，还有内部有许多皱褶、面积小于等于 $1000cm^2$ 的筒状滤器（表 10.6）；还有负压过滤法，即将一个真空瓶与滤器相连（参见方案 10.11）。负压过滤虽然需要一个真空管或真空泵，却是一种简单有效的过滤方法，因为过滤后的液体可直接收集至瓶中储存起来。不过负压过滤会导致 pH 升高，因为溶解在培养基中的 CO_2 会丢失，所以，瓶子在储存培养基前，可能需要充适当浓度的 CO_2 气体（表 8.1、表 8.2）。

过滤灭菌的程序需要做质控，通过发泡点试验（bubble-point testing）确认滤膜的完整性，即确认滤膜在承受超过灭菌压力的情况下没有形成气泡，这时在湿滤膜的高压一侧只有空气。适当的无菌控制也包括确认膜是无菌的（参见第 10.6 节）

各种物品的适宜消毒方法（表 10.2、表 10.3）将在随后的章节中阐述。

表 10.2 仪器与设备的消毒

项目	消毒方式
冷冻用安瓿，玻璃制品	干热[a]
冷冻用安瓿，塑料制品	高压灭菌[b]（通常买消毒过的）
装玻璃和硅树脂试管的器皿	高压灭菌
一次性微量移液管吸头	在可高压灭菌的盘或尼龙袋中，高压灭菌
滤器，可重复使用	高压灭菌；不要使用预真空或后真空，通过置换去除空气
玻璃器皿	干热
带螺口盖的玻璃瓶	高压灭菌，将盖旋松
盖玻片	干热

续表

项目	消毒方式
载玻片	干热
玻璃注射器	高压灭菌，如果为 PTFE，要将塞子分开
解剖用仪器	干热
磁力搅拌棒	高压灭菌
巴斯德吸管，玻璃制品	干热
吸管，玻璃制品	干热
树脂玻璃，塑胶，透明合成树脂	70%乙醇，可使塑料产生裂痕
聚碳酸酯	高压灭菌
重复使用的移液管或注射器	高压灭菌，将 PTFE 活塞与玻璃针筒分开
螺口盖	高压灭菌
硅树脂油脂（分离克隆用）	在玻璃皮氏培养皿中高压灭菌
硅树脂试管	高压灭菌
塞子，橡胶和硅树脂制品	高压灭菌
试管	干热

a 干热：160℃（320℉），1h
b 高压灭菌：100kPa（1bar*、15lb/in^2），121℃（250℉），20min

表 10.3 溶液的消毒

溶液	消毒	保存
琼脂	高压灭菌[a]或煮沸	室温
氨基酸	过滤[b]	4℃
抗生素	过滤	–20℃
Bacto-蛋白胨	高压灭菌	室温
牛血清白蛋白	过滤（用重叠式过滤器）	4℃
羧甲基纤维素	蒸汽，30min[c]	4℃
胶原酶	过滤	–20℃
DMSO	本身无菌；分装至无菌的刻度试管中	室温；避光，避免接触橡胶或塑料（聚丙烯除外）
药物	过滤（检查是否结合在滤膜上；如果需要可使用低结合滤膜，如 Millex-GV）	–20℃
EDTA	高压灭菌	室温
葡萄糖，20%	高压灭菌	室温
葡萄糖，1%~2%	过滤（低浓度；如果高压灭菌会变焦）	室温
谷氨酸盐	过滤	–20℃
甘油	高压灭菌	室温
生长因子	过滤（用低蛋白结合的滤膜）	–20℃
HEPES	高压灭菌	室温
HCl，1mol/L	过滤	室温

* 1 bar=10^5 Pa。

续表

溶液	消毒	保存
乳白蛋白水解产物	高压灭菌	室温
甲基纤维素	高压灭菌	4℃
$NaHCO_3$	过滤	室温
NaOH，1mol/L	过滤	室温
酚红	高压灭菌	室温
盐溶液（不含葡萄糖）	高压灭菌	室温
血清	过滤；用重叠式过滤器	–20℃
丙酮酸钠，100mmol/L	过滤	–20℃
转铁蛋白	过滤	–20℃
胰蛋白	高压灭菌	室温
胰蛋白酶	过滤	–20℃
维生素	过滤	–20℃
水	高压灭菌	室温

a 高压灭菌，100kPa（1bar，15lb/in^2），121℃（250℉），20min
b 过滤，孔径 0.2μm
c 蒸汽，100℃，30min

10.3 设　备

10.3.1 玻璃器皿

如果玻璃器皿表面用于细胞黏附生长，那么除了严格的清洁之外，还应带有相应的电荷。具有腐蚀性的碱性清洁剂使玻璃器皿的表面不利于细胞贴壁，需要用 0.1mol/L 盐酸或硫酸进行中和，而中性清洁剂不会改变玻璃器皿的表面电荷，可以用去离子水、蒸馏水或反向渗透水去除。最为有效的清洁程序如下所述。

（1）不要让沾污的玻璃器皿变干，在浸泡沾污的玻璃器皿的水中要加入杀菌剂，如次氯酸钠，用于：①去除任何有潜在危害的物质；②防止水中微生物的生长。

（2）要选择在水中有效的清洁剂，且易于冲洗、没有毒性（参见 10.3.4 节）。

（3）玻璃器皿烘干前要确保用自来水彻底冲洗干净，再用去离子水或蒸馏水冲洗。

（4）倒转玻璃器皿以利于其晾干。

（5）通过干热对玻璃器皿进行灭菌，以减少蒸汽灭菌时产生有毒残留物沉淀的风险。

设计的灭菌步骤不仅要能杀死可复制的微生物，也要能消除有抵抗力的孢子。湿热法比干热法有效，但有产生残留物的风险。干热消毒更可取，但温度应在 160℃（320℉）以上且维持 1h。

如果使用加压蒸汽灭菌法，要将 Thermalog 指示器（参见补充材料中的附录III）或记录型温度仪的温度探头插入灭菌锅的样品中，灭菌锅的中央，在灭菌过程中监测温度和湿度（参见第 10.2.5 和图 4.23b）。

详见方案 10.1。

方案 10.1 玻璃器皿的准备和灭菌

材料

- 消毒剂：次氯酸盐，用清洁剂稀释，最少应含有 500~1000μg/g 的有效氯，如常规用的次氯酸钠药片 Presept tablets（Amax，Medisave），Haz-Tab（Guest Medical）或 Clorox（另见补充材料中的附录III）；重度污染的物质可能需要高达 5000μg/g 的有效氯（WHO，1989），1%的 Virkon 可用于替代次氯酸盐，但对于朊病毒无效。
- 清洁剂（如 7×™或 Decon®）
- 浸泡池
- 试管刷
- 不锈钢篮子（盛放漂洗过的玻璃器皿然后晾干）
- 铝箔
- 无菌指示器（适用于干热消毒：Steraffirm、Steris）
- 无菌指示胶带或标签（3M Comply；Camlab；Steris；VWR）：这与高压灭菌器中的无菌指示胶带不同，因为烤箱中的温度更高，大多数用于高压灭菌器中的无菌指示胶带会烤焦，黏合剂中的易爆炸成分就会残留在烤箱甚至玻璃器皿中
- 灭菌烤箱：在有风扇的情况下温度可以达到 160℃（320℉），宜使用可记录温度计和易弯曲的探针

操作步骤

A. 玻璃器皿的收集和清洗（图 10.2）

1. 玻璃器皿用后要立即将其收集到含有消毒剂的清洁剂中。在浸泡或清洗前绝不能让玻璃器皿变干，否则会非常难清洗。
2. 在清洁剂中浸泡过夜。
3. 漂洗。

   (a) 手工：次日早，刷洗玻璃器皿，自来水冲洗 4 次后用去离子水、蒸馏水或反渗（RO）水（半纯水 SPW）冲洗 3 次。有一种水流喷射装置非常有用，此外，每次都要将瓶子完全装满后再倒空。将许多瓶子固定在篮子中会使冲洗速度加快。

   (b) 机器：清洗不需要清洁剂。如果接一个龙头（参见 4.4.11 节），则可减少两次自来水冲洗和一次去离子水或反渗（RO）水冲洗的过程。不需要用去污剂进一步清洗。
4. 在彻底冲洗之后，将瓶子及其他玻璃器皿倒置在不锈钢篮子中烘干。
5. 冷却后用铝箔封口保存。

B. 消毒

1. 在玻璃器皿上贴上小正方形的无菌指示胶带或其他的指示标签，并写上日期。
2. 将玻璃器皿放入烤箱中，烤箱应有可循环空气的风扇，并将温度设定在 160℃（320℉）。
3. 确保烤箱的中央温度达到 160℃（320℉）。

   (a) 将一个无菌指示器放入瓶中或其他器皿内，置于烤箱中央。

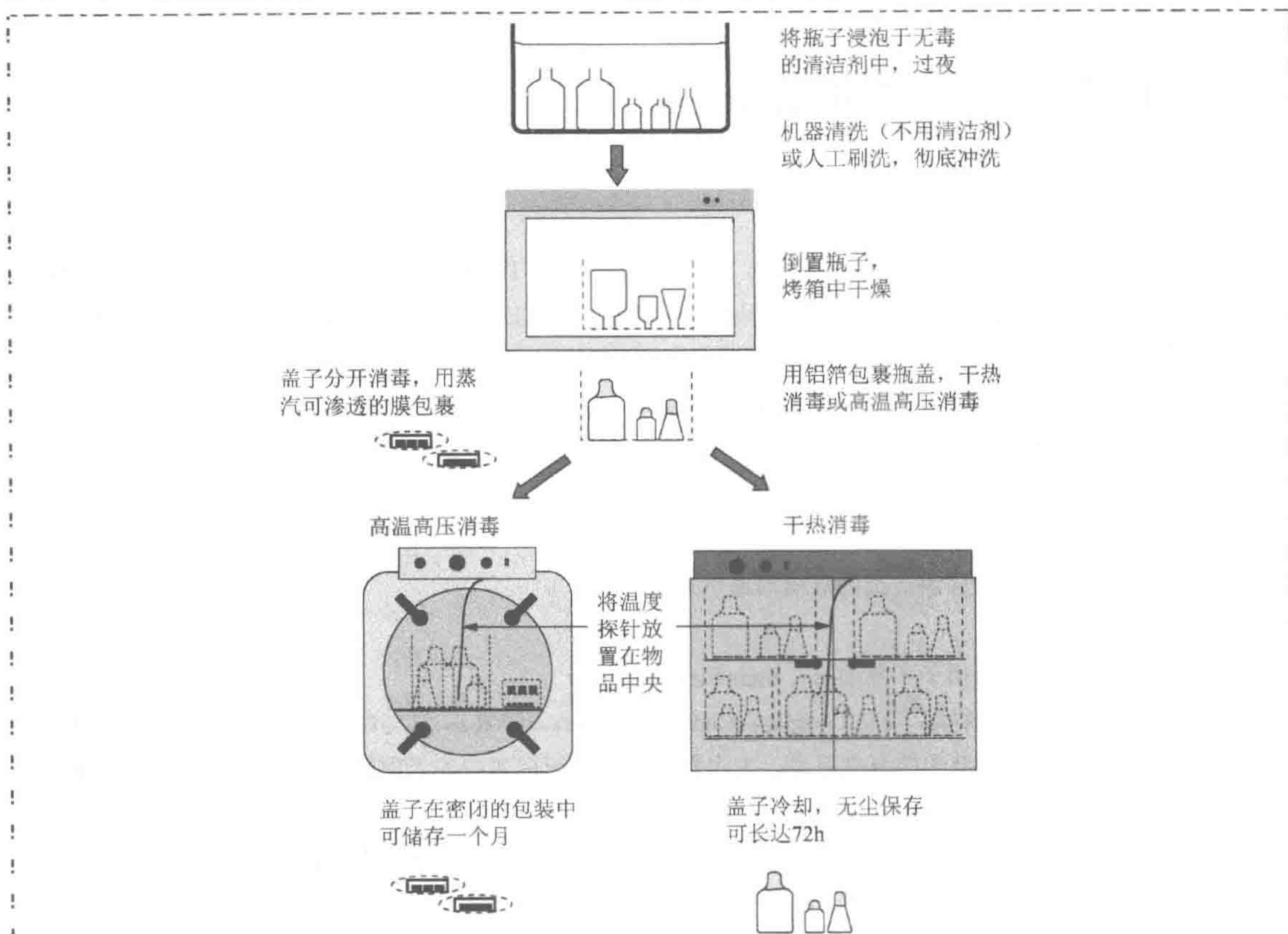


图 10.2　玻璃器皿的清洗与灭菌。灭菌条件是：高温高压 121℃（250℉），15min；烤箱，160℃（320℉），1h（参见方案 10.1）。高温高压消毒时，瓶盖应从瓶上卸下来，避免消毒时在瓶内产生冷凝作用（图 10.3）

（b）如果用可记录的温度计，将感应部分放入瓶中或其他器皿内，置于烤箱中央。

（c）不要将物品堆得过紧，要留出热空气对流的空间。

4. 将烤箱盖好，检查温度旋钮是否在 160℃（320℉），用胶带将烤箱封好并按预定时间保持 1h（或用自动锁和自动记录仪）。

5. 1h 后将电源关掉，不开箱冷却。如果有自动计时器则非常方便，因为它晚上能自动断电，次日早就可以继续实验。这样做可使冷却在无菌的环境中进行，也使白天产生的热量降低到最少，而白天产热是最难处理的。

6. 消毒的玻璃器皿要在 24~48h 使用。

有机物要放在烤箱外面。不要用纸质的胶带或包装材料，除非你能确定其加热时不会产生爆炸性物质。这些物质最终会留在烤箱中，加热时会产生气味，有的会残留在正消毒的玻璃器皿中（参见图 10.7，门上）。

用 121℃（250℉）高压灭菌 20min，要经过一个前真空和后真空的循环（参见 4.4.3 节），可以将瓶子的螺口盖松开或用铝箔包住口，而后再贴上高压灭菌胶带。待冷却后，再将松开的瓶盖拧紧。在高压灭菌的过程中，瓶盖应拧得非常松（松开完整一圈），这样做是为了让蒸汽进入瓶中，也能阻止垫片（如果有）被瓶盖吸住而堵住瓶口。在高压灭菌器的灭菌过程中如果瓶口被堵住，会导致灭菌不完全（图 10.3 和彩版 22a）。不幸的是，在高压灭菌过程中经常会出现薄雾，


彩版 22

在薄雾蒸发的过程中会在瓶中留有残留物。同时瓶子在密封之前，冷却的时候也可能被未消毒的空气所污染。干热灭菌相对好一些（湿热灭菌要将盖子与瓶子分开，见 10.3.1 节），因为它可使瓶子在移动之前在烤箱中直接冷却。

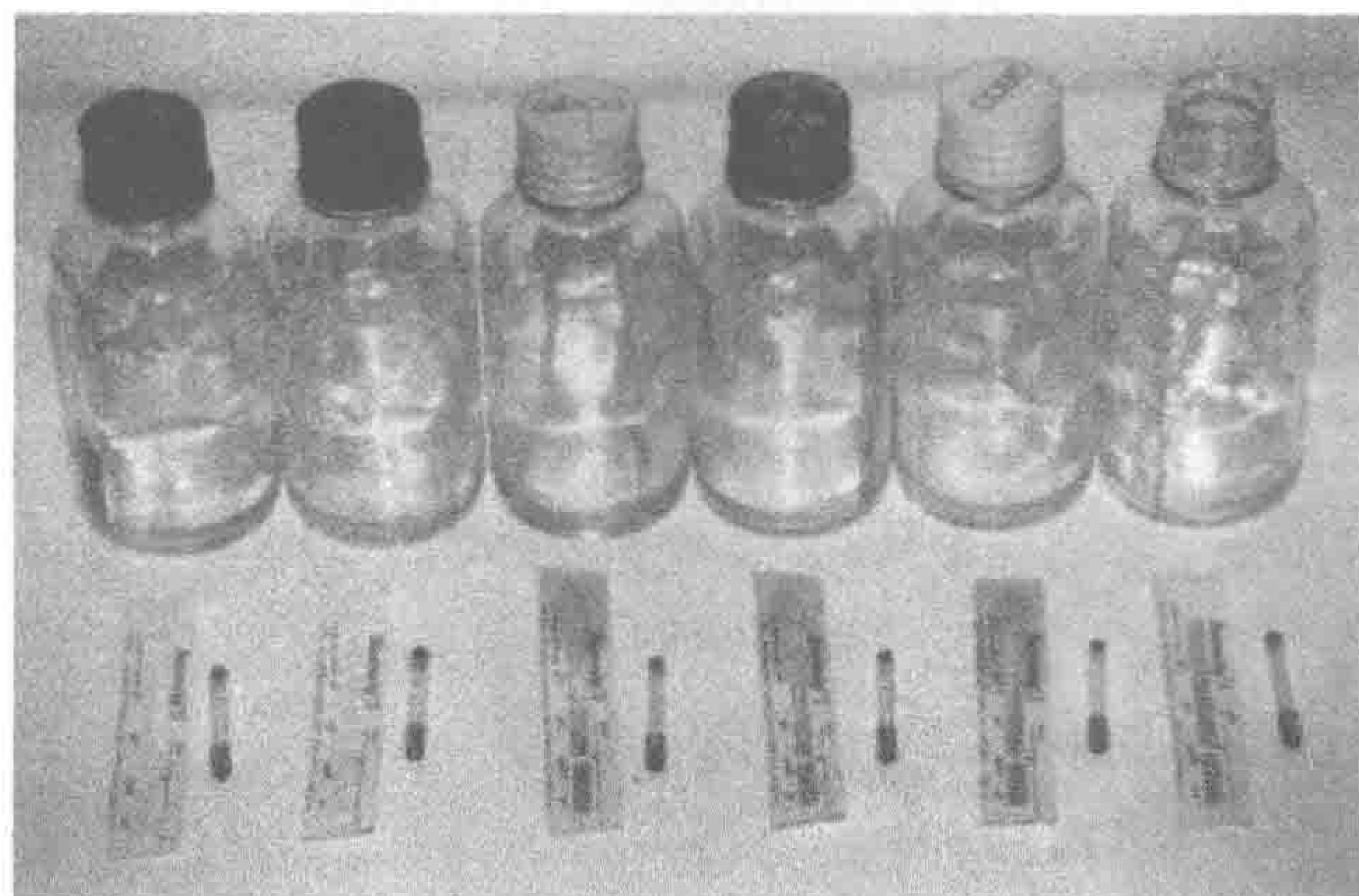


图 10.3 消毒带盖的瓶子。这些瓶子在高压灭菌时瓶中装有 Thermalog 无菌指示带。在高温和蒸汽的条件下，Thermalog 无菌指示带变为蓝色，在所要求的灭菌条件下，蓝色区域随着时间的推移会沿着试纸移动。图中最左边的瓶盖拧得最紧，然后依次变松，直到最右边的瓶子没有盖子。最左边的瓶子没有被灭菌，因为没有蒸汽进入。第二个瓶子也没有被灭菌，因为瓶内的垫子将瓶口封住。其余三个瓶子均被灭菌，但是瓶中的棕色无菌指示带显示在最后的循环中有液体产生。只有最右边的瓶子被灭菌并干燥。玻璃指示剂（Browne's 管）显示各个瓶子均已灭菌（亦见彩版 22a）

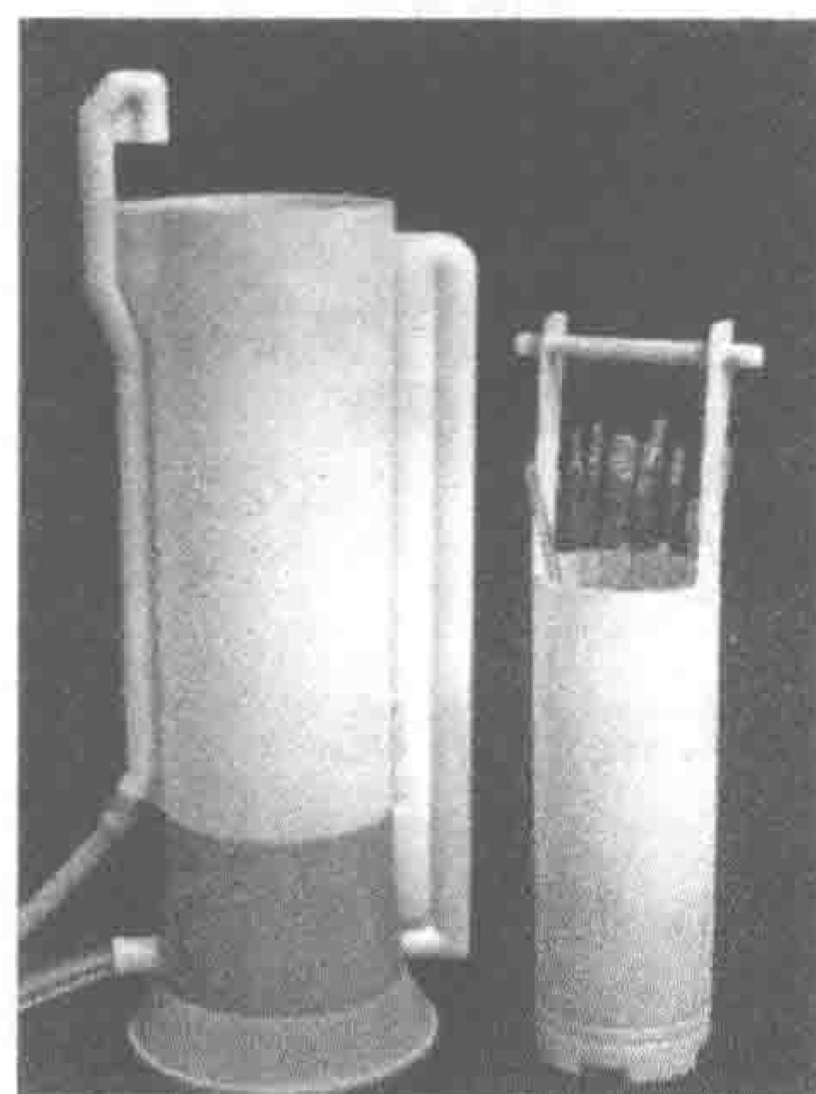


图 10.4 虹吸移液管清洗机。与水源相连，缓慢地加入水以产生虹吸作用，将主室中水排空，然后再灌满。如此重复多次，清洗过程超过 4~6h。图中所示吸管是用后收集起来的，装吸管的提篮在放入清洗机之前，应拔掉吸管上的棉花，将吸管倒置，如图 10.5 所示



彩版 22

10.3.2 玻璃移液管

玻璃和塑料移液管都可用于组织培养。塑料移液管的优点是单个包装一次性使用，不需要清洗和灭菌。玻璃移液管则非常便宜，但每次使用时都要去掉棉花塞，再塞上新的棉花，并要用移液管清洗器非常仔细地清洗（图 10.4），以避免残留污物使移液管堵塞，详见方案 10.2。

▲**安全提示** 玻璃移液管容易损坏，破损的末端对使用者和清洗人员都有严重的危害，应将其抛弃或对其进行修理。

方案 10.2 玻璃移液管的准备和灭菌

材料

- 移液管圆筒（用于收集用过的移液管）
- 消毒剂：次氯酸盐，用清洁剂稀释，最少应含有 500μg/g 的氯（如 Presept 片、Clorox，或 Virkon）

- 清洁剂（如 7×或 Decon®）
- 不锈钢篮子（收集清洗过的移液管然后晾干）
- 无菌指示器（参见第 10.2.5 节，方案 10.1 和补充材料中的附录III）
- 移液管罐：正方形的铝或不锈钢的容器，两端分别有硅树脂垫，正方形的罐子不会在工作台上滚动（Thermo Fisher、Thomas Scientific）
- 无菌指示胶带或标签（参见第 10.2.5 节，方案 10.1 和补充材料中的附录III）
- 灭菌烤箱，在有风扇的情况下温度可以达到 160℃（320℉），更适宜使用可记录温度计和易弯曲的探针

操作步骤

A. 收集和清洗

1. 将含有消毒剂的清洁剂倒入装移液管的圆筒中。
2. 用后取掉吸头，立即将移液管弃于圆筒中（图 10.5）。

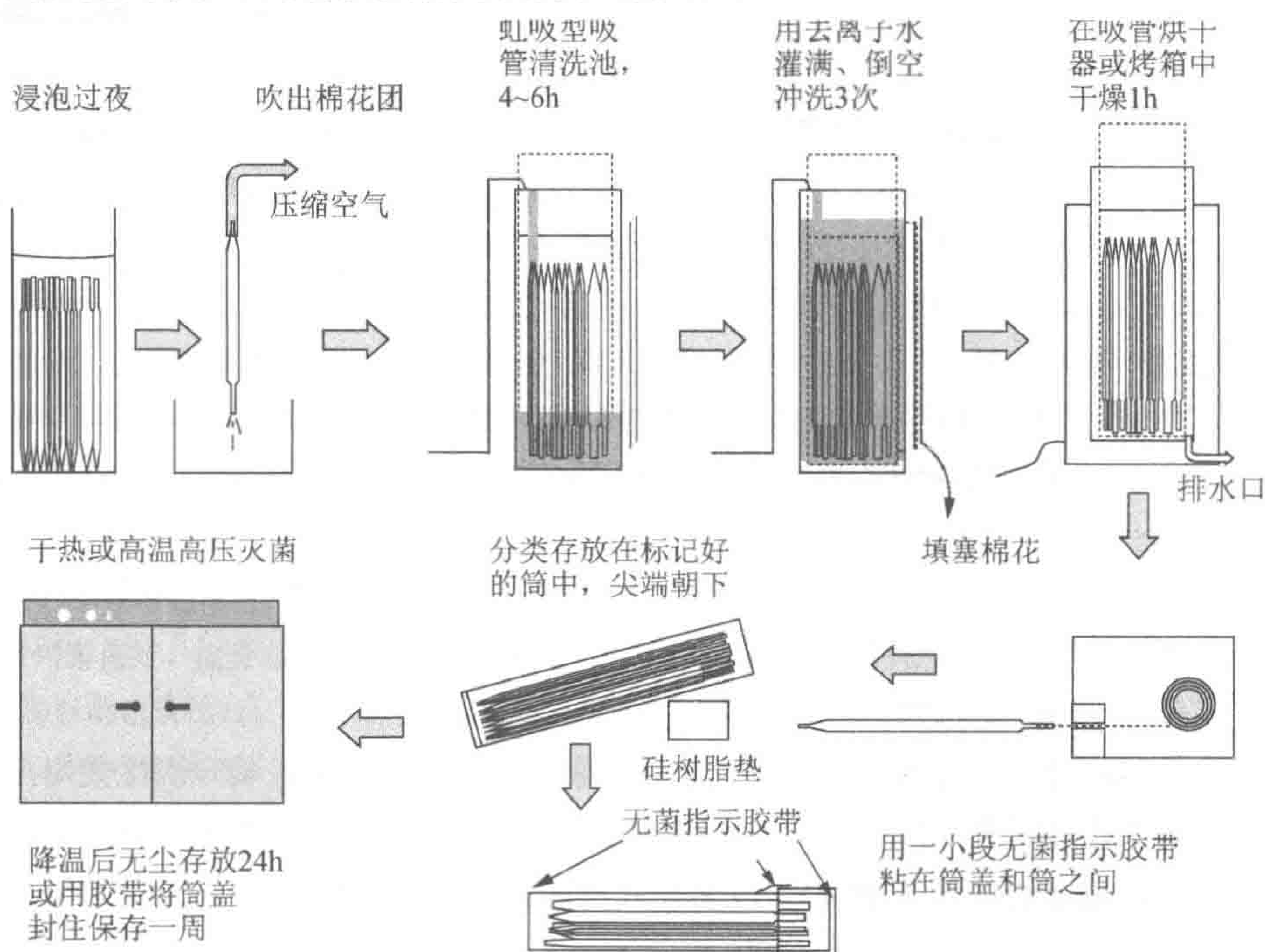


图 10.5 吸管的清洗和消毒。用压缩空气去掉棉花塞（左上），将吸管放在清洗机中通过自动重复的清空灌满步骤来清洗，清洗之后将吸管放入干燥器中干燥（右上），干净的吸管被重新塞入棉花（右下，另见图 10.6），而后放入罐中，用消毒显示胶带密封罐口，放入热空气中灭菌至少 1h（另见图 10.7）

(a) 不要将移液管放在层流洁净台内，也不能让它变干。

(b) 不要将用于吸琼脂或硅树脂（防水剂或防沫剂等）的移液管与普通移液管放在同一个圆筒中。可用一次性的移液管吸硅树脂，吸完琼脂的移液管应用加热的自来水清洗，或者也可用一次性的移液管。

3. 移液管需浸泡过夜或至少 2h。如果移液管的用量很多，应不时更换装满的圆筒，在清洗循环开始

前先浸泡 2h。

4. 浸泡后通过压缩空气取出棉花塞。

5. 将移液管放入移液管清洗器中（图 10.4、图 10.5），尖端朝上。

6. 用自来水通过清洗器的虹吸作用清洗移液管，至少 4h，也可用带有移液管接头的自动清洗机来清洗，但不要加清洁剂。

7. 将阀门转到去离子水（DW）或反渗水（ROW）处（参见图 4.22、图 10.9），或者等自来水冲洗完毕后，再用 DW 或 ROW 灌满、倒空，重复冲洗 3 次（在玻璃器皿清洗机中用自动去离子水漂洗循环）。

8. 将移液管放入移液管干燥机或烤箱中，尖端朝上。

9. 用棉花塞住管口（图 10.6）。

10. 将移液管按大小分类并储藏在无尘环境中。

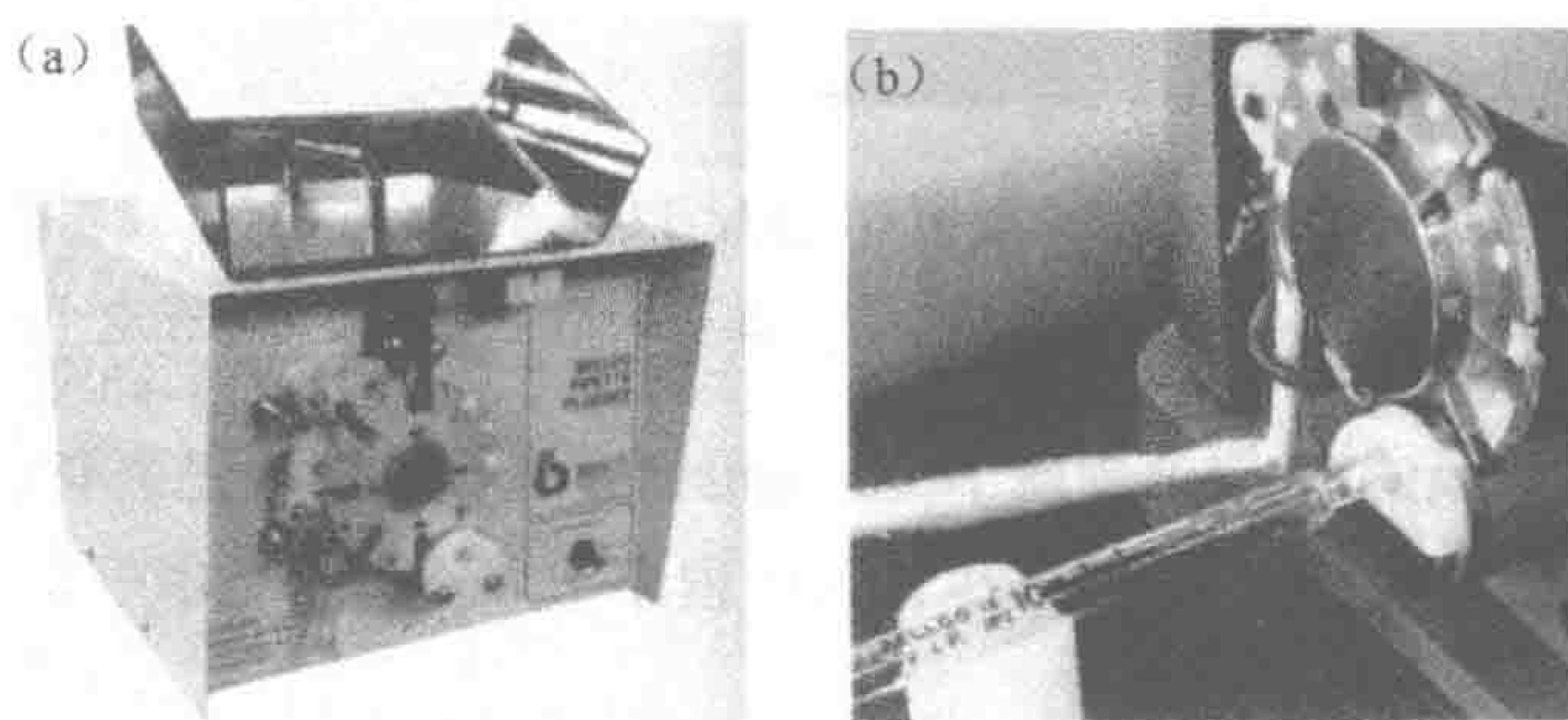


图 10.6 半自动吸管填塞器（Bellco）。（a）翻开前盖的吸管填塞器（Bellco）（操作时前盖总是放下的）；（b）一股棉花绳通过一个孔塞入吸管的一端，达到大致的长度时就被切断（照片显示的是老样式），不同的吸管需要塞入的棉花绳粗细不同

B. 灭菌

1. 将移液管放入装移液管的罐中（两端贴上标有移液管大小的标签便于使用）。

2. 每个罐子装同一大小的移液管。

3. 少数几个罐子装 1mL、2mL、10mL、25mL 混合的移液管（如每个型号装 4 个）。

4. 在盖子和罐子之间贴上无菌指示胶带，并在胶带上写上日期。

5. 干热灭菌，160℃（320℉），1h。要尽可能少用胶带，或换用温度指示标签（Alpha Medical; Bennett），此标签很小并不含爆炸性物质。要在烤箱的中心检测温度，以保证这个最难到达的部位也能满足最低的灭菌条件。要保证烤箱中的罐子之间有一定的空隙，这样可以使热空气流通（图 10.7）。

6. 从烤箱中取出移液管，冷却后将罐子拿到组织培养实验室。移液管如果要放置 48h 以上，就要沿着罐子盖周围贴上一圈胶带。

10.3.3 螺口盖

尽管培养瓶现在几乎都是塑料的、一次性的，但玻璃试剂瓶仍然要用于储存水、培养基、盐溶液，或特殊的试剂。玻璃瓶常用的盖子有两种：①铝或酚醛树脂塑料盖，内垫为合成橡胶或硅

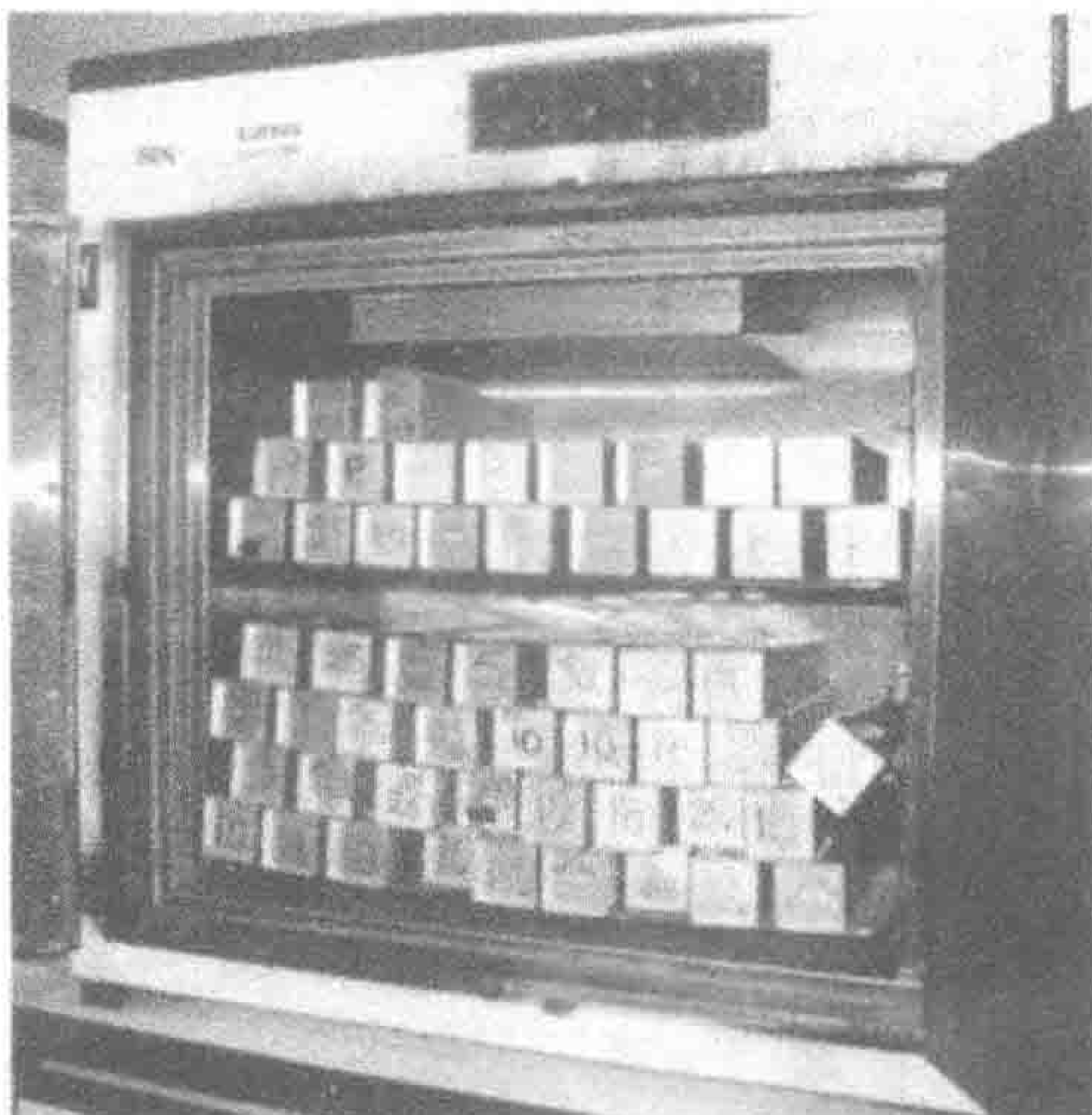


图 10.7 灭菌烤箱。装吸管的筒罐摆放时彼此要留有空隙，以便热空气的流通。烤箱前面被染成棕色表明有来自无菌指示带的易挥发性物质存在，在热烤箱中使用胶带存在这个问题

树脂；②可以反复使用的无内垫聚丙烯盖子（Duran）。后者能很好地包裹瓶口，盖内有一个垫圈，这样有利于密封和防止瓶子内液体流出（尽管灭菌程序中并不推荐将瓶子放倒）。详见方案 10.3。下列注意事项必须遵守。

（1）无内垫的盖子更好，如果使用带内垫的酚醛树脂盖或铝盖，清洗时应当将内垫取出清洗。

（2）只有在瓶口没有破损且拧得很紧的情况下，聚丙烯盖子才可作密封使用。丢弃瓶颈部破损的瓶子。

（3）不要将铝盖或任何铝制品放入碱性清洁剂中超过 30min，因为它们会被腐蚀。

（4）不要将玻璃器皿和盖子一同浸泡在清洁剂中，因为铝可能会污染玻璃。

（5）避免使用所谓的为清洗机制造的清洁剂，因为它们都有高度的腐蚀性。

方案 10.3　螺口盖的准备和灭菌

材料

- 消毒剂：次氯酸盐，氯的浓度为 500ppm（如常规的药片）或 Virkon（DayImpex、Neogen、Dupont）
- 清洁剂（如 7×或 Decon®）
- 浸泡池
- 不锈钢篮子（收集盖子以便漂洗和晾干）
- 无菌指示器（如 Thermalog，另见补充材料中的附录III）
- 玻璃 Petri 培养皿（VWR；包装用）
- 可高压灭菌的尼龙膜（如 Portex）或纸袋（如 Cardinal Health Convertors；VWR；另见补充材料中的附录III）
- 用于无菌指示的高压灭菌胶带
- 高压灭菌器（如 Astell；LTE；Steris；Tuttnaure），有可记录式温度计和能插入样品中的易弯

曲的探针（参见图 4.23b）

操作步骤

A. 清洗

1. 在清洁剂中最多浸泡 30min。

2. 完全清洗 2h。

(a) 有内垫的金属或酚醛树脂盖

确保所有的盖子都已浸没，内垫应取出并在清洗后放回原处。方法有两种：

(i) 在烧杯（或不锈钢桶）中，将流动的自来水用管子引至底部从下至上冲洗。每隔 15min 用手搅一下盖子。

(ii)将盖子装在篮子里或最好用移液管清洗装置放在自动清洗机中漂洗，但最好不要加清洁剂。

(b) 聚丙烯盖子

(i) 这种盖子可以用上述方法手工清洗（如果需要可用清洁剂浸泡）。由于盖子可能会漂起来，因此在浸泡和清洗的过程中要尽量使其下沉。

(ii) 如果用自动清洗机清洗，在用清洁剂浸泡后，可将盖子装入移液管清洗装置，放在机器中用不加清洁剂的正常循环程序清洗。

(c) 塞子

(i) 密封性能好的盖子比塞子好用，但如果必须用塞子，最好用硅树脂或无重金属的白橡胶制品，而不要用天然橡胶制品。

(ii) 清洗和灭菌过程与盖子相似（漂洗过程不存在漂浮问题）。

B. 灭菌

1. 将盖子开口朝下扣在玻璃培养皿中。

2. 用图画纸或蒸汽可浸透的尼龙膜将装有盖子的 Petri 培养皿包起来，用高压灭菌胶带密封（图 10.8）。

3. 做一个类似的袋子将灭菌指示器放在里面，而后置于消毒器的中央。

4. 高压灭菌，121℃（250℉），100kPa（15psi*），20min（图 10.9）。

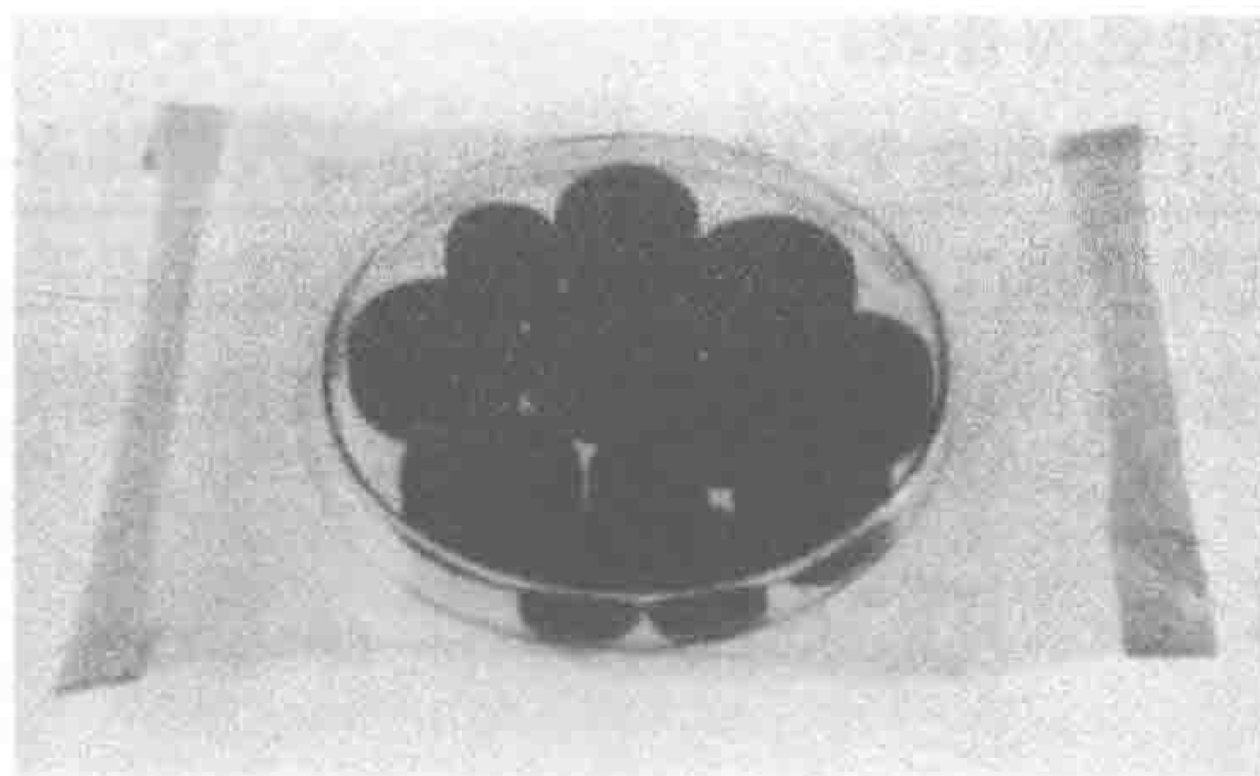


图 10.8 包装螺口盖进行灭菌。将盖子放到玻璃培养皿中，然后放入可进行高压灭菌的尼龙袋子中，用高压灭菌无菌指示胶带封口

* 1 psi=1 in^{-2}=0.155cm^{-2}。

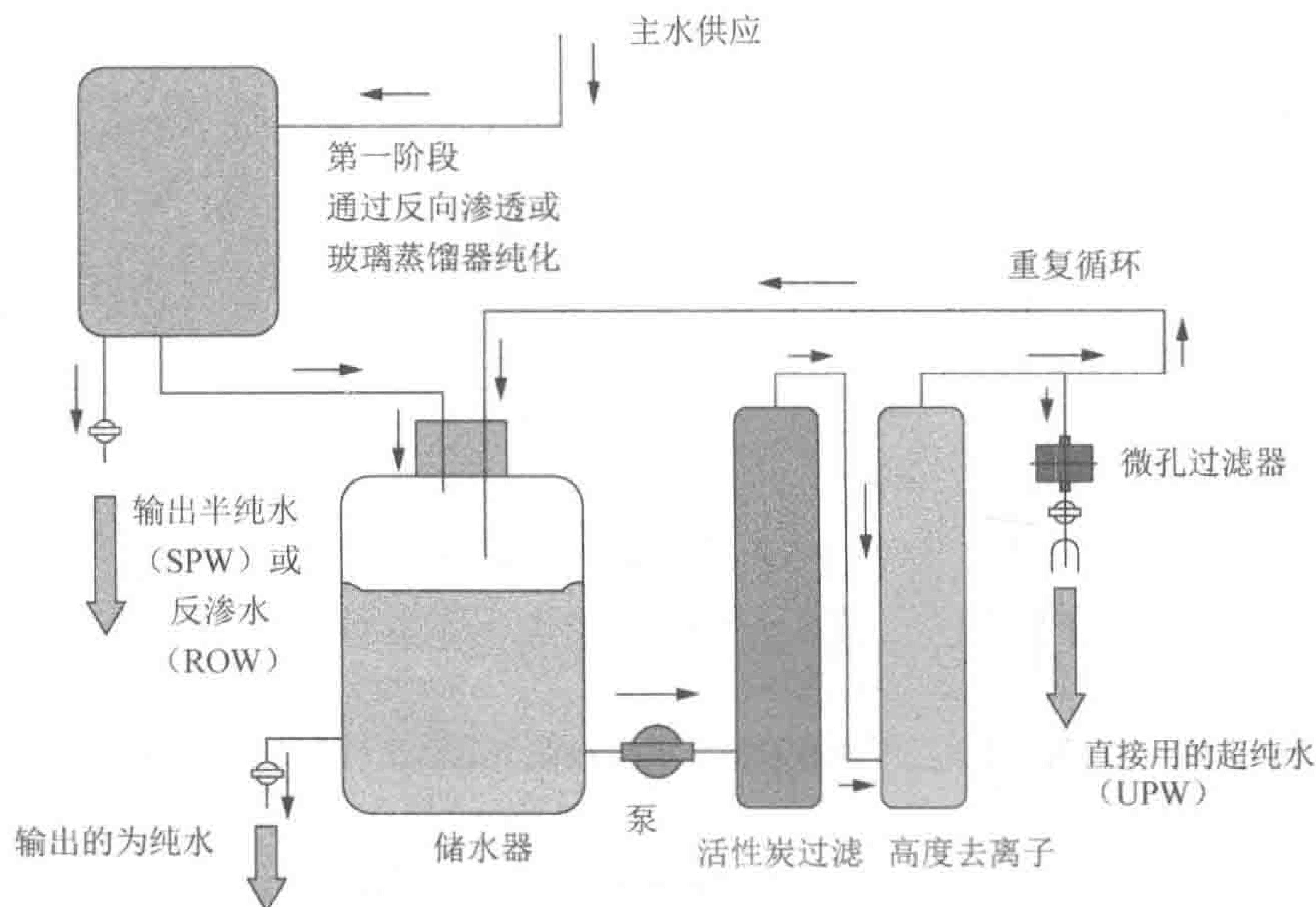


图 10.9 水的纯化。将自来水通过反向渗透或玻璃器蒸馏后灌到储存器中。然后，将半纯水（SPW）经过活性炭、去离子和微孔过滤重新循环到储存器中。纯水（PW）用于配制试剂，随时可从储存器中取出；超纯水（UPW）用于配制培养基，从微孔过滤器取出用水（在图的右侧）。如果仪器继续循环，早晨的第一件事就是收集最高纯度的水用于配制培养基（另见图 4.22）

10.3.4 清洁剂的选择

当多数培养使用玻璃器皿时，玻璃表面的质量（电荷、化学残留物）至关重要。而现在大多数细胞培养使用的是一次性的塑料器皿，所以对于清洗玻璃器皿的主要要求是：①能有效地去除玻璃器皿上残留的清洁剂；②清洗后无毒性残留物，以避免随后被带入储存于这些玻璃瓶的培养基或其他试剂中。一些组织培养的供应商会提供合适的清洁剂，该清洁剂已通过培养过程的检测，如 7×（MP Biomedical），或用于手工清洗的 Decon（Medisave），机器用清洁剂通常由实验室设备供应商或机器生产厂家提供。通过清洗重度沾污的玻璃器皿（如经过高温高压处理过的装过血清的瓶子或装过含有血清的培养基的瓶子），可以检测清洁剂的效果，用正常的清洗程序简单清洗一次可直观地说明哪种清洁剂更为有效。

细胞接种率（参见方案 10.15、方案 23.10）是检测有毒残留物存在的最好方法，例如，按前面介绍的方法用清洁剂清洗玻璃培养皿（参见方案 10.1），然后用干热法消毒，用塑料培养皿作对照，同时做细胞克隆化培养实验。该项技术也可用于检测高压灭菌后玻璃器皿内是否有残留物。

10.3.5 种类繁杂的设备

清洗 所有新的仪器和材料（硅树脂管、过滤器架子、器械等）都需要用清洁剂浸泡过夜，彻底漂洗后晾干。在清洁剂中会被腐蚀的物品（低碳钢、铝、铜、黄铜等）应直接手工清洗，而无需浸泡（如果需要，只能用清洁剂浸泡 30min），然后漂洗晾干。

用过的物品应用自来水冲洗，并立即放入清洁剂中浸泡，让它们浸泡过夜，如果需要就刷洗

一下，然后用 SPW 冲洗晾干。再次强调，不要让能被清洁剂腐蚀的物品浸泡在清洁剂中的时间超过 30min。铝制的离心桶或转头绝对不能浸泡在清洁剂中。

在处理硅树脂油脂或硅树脂液体材料时要特别小心。这些材料最好丢弃，如果要保留就要分开处理，如果需要，可用四氯化碳去除硅树脂。硅树脂如果覆盖到其他器皿，尤其是在玻璃器皿上时，则很难去除。同样，如果物品盛过琼脂或琼脂糖，难以清洗，最好丢弃，如要保留，可用沸水清洗。

包装 所有用于消毒的器皿均应包裹，且要保证蒸汽能渗入（图 10.1、图 10.8），而灰尘、微生物和微小的东西不能渗入。可使用灭菌之后能显示无菌标记的专用袋子（Cardinal Health Convertors），以及成卷的半透性透明尼龙膜（如 Portex），扁平管状，有不同的直径，贴上无菌指示胶带可将它们做成袋子（如 Camlab、Fisher、Steris、VWR，另见补充材料中的附录Ⅲ，可高温高压灭菌的袋子和薄膜），尽管这种尼龙膜非常昂贵，但在损坏前可以反复使用多次。

试管和有孔的物品在包装前应封上胶带和纸或尼龙膜，针头或尖锐的器械要用玻璃试管或其他合适的防护装置装好。

灭菌 根据材料的不同选择不同的灭菌方法（表 10.1）。金属材料最好采用干热灭菌法。硅树脂橡胶（它比天然橡胶好）、PTFE、聚碳酸酯、乙酸纤维素、硝酸纤维素过滤膜等应采用高压灭菌法，在 121℃（250℉）、100kPa（1bar，15lb/in^2）保持 20min，并使用前真空和后真空的循环步骤，但安在过滤装置中的滤膜除外（参见方案 10.4）。使用小型轻便高压灭菌器和压力锅，要确保加压过程中，在所有空气被替换之前，高压灭菌器内的水要沸腾 10~15min（注意在开始的时候要放入足够的水，以确保能形成蒸汽）。灭菌后，放出蒸汽，将器皿取出，在烤箱或架子上晾干。每次进行准备和灭菌都应确保有适当的记录（表 10.4、表 10.5）。

表 10.4 水纯度级别

污染物	参数	3 级	2 级	1 级
离子	25℃时的电阻率，MΩ/cm	0.2	1	10
	25℃时的电导率，μS/cm	5.0	1.0	0.1
酸碱度	25℃时 pH	5.0~7.5	—	—
有机物	TOC ppb*（μg/L）	<200	<50	<10
总固体物	颗粒物>0.2μm，mg/kg	2	1	<1
胶体	二氧化硅，ppb	<1000	<100	<10
细菌	CFU/mL	<1000	<100	<1

表 10.5 推荐使用的记录表

批次		1	2	3	4	5	等
时间		16/2/14	17/2/14				
溶液		HBSS	水				
仪表读数	MΩ/cm[1]	—	10				
	pH	6.5	6.8				
	mOsmol/kg	290	—				
	TOC[2]	—	10				
灭菌	Min[3]	20	20				
	℃	121	121				

* 1 ppb=1×10^{-9}。

续表

批次		1	2	3	4	5	等
灭菌							
	胶带[4]	+ve	+ve				
	指示器[5]	+ve	+ve				
储存	存放位置	冷室	实验室				
	℃	4	20				
	日期	17/2/14	18/2/14				
质控	无菌测试	37℃ OK	37℃ OK				
	细胞生长	—	—				
	PE	—	—				
	其他	—	—				

1 电阻；也可用传导率，μS/cm
2 有机碳总量，以 ppm 表示
3 温度达到 121℃时开始计时
4 灭菌显示胶带，+ve 表示适当的标志已经出现
5 将指示器放在位于消毒器中央的容器中；+ve 表示显示带的颜色变化或位置都确认条件合适

▲安全提示 为了避免烫伤，在释放蒸汽和处理热的器皿时要十分小心。戴一个到肘部的隔热手套，在打开门或盖子时，要将脸部避开。高压灭菌器应有安全阀，避免过早打开。

10.3.6 可重复使用的灭菌过滤器

尽管现在多数实验室使用一次性的过滤装置，但有些大批量培养可能需要使用不锈钢过滤装置（表 10.6）。过滤装置应按照方案 10.4 进行准备与灭菌。

表 10.6 过滤器大小及溶液体积

过滤器大小及名称	一次性使用（D）或可重复使用（R）	大约的过滤量	
		结晶体	胶体
25mm，Millex	D	1~100mL	1~20mL
47mm 或 Sterivex 滤筒	R，D	0.1~1L	100~250mL
90mm	R	1~10L	0.2~2L
Millipak-20	D	2~10L	200mL~2L
Millipak-40	D	10~20L	2~5L
Millipak-60	D	20~30L	5~7L
Millipak-100	D	30~75L	7~10L
Millipak-200	D	75~150L	10~30L
Millidisk	D	30~300L	5~50L
142mm	R	10~50L	1~5L
293mm	R	50~500L	5~20L

注：表中的例子引自 Millipore 目录。Thermo、Scientific-Nalgene、Sartorius 及其他供应商的产品与之类似（参见补充材料中的附录III）

方案 10.4 过滤装置的灭菌

材料

非无菌

- 过滤器外壳（表 10.4）
- 与过滤器相对应的微孔滤膜
- 预过滤器、玻璃纤维（如果需要）
- 蒸汽可渗透的尼龙膜（如 Portex）或高压灭菌袋（Cardinal Health Convertors；VWR）
- 高压灭菌无菌指示胶带（参见第 10.2.5 节）
- 灭菌锅

操作步骤

1. 用清洁剂完全清洗后（参见 10.3.6 节），用水冲洗过滤装置，然后用半纯水（SPW）冲洗，并晾干。
2. 在过滤器中插入滤板，然后将过滤膜放到滤板上，如果过滤膜是由多聚碳酸盐制成的，要弄湿以消除静电。
3. 将玻璃纤维和其他需要的预过滤器（参见 10.5.3 节）放在过滤器的顶端。
4. 装配过滤器，但不要完全拧紧（可以留一个螺圈）。
5. 过滤器的进口与出口均用铝箔封住。
6. 用消毒纸或蒸汽可渗透的尼龙膜将过滤器包好，贴上无菌指示胶带。
7. 在 121℃（250℉）、100kPa（1bar，15lb/in^2）高压灭菌 20min，不进行前真空和后真空的循环步骤；在开始灭菌程序前使用上升或下降 10~15min 以排除空气（使用自动高压灭菌器时，要用“液体循环”这个程序）。
8. 将滤器取出，然后冷却。
9. 在过滤开始、过滤膜已经湿了的时候，才能将过滤器支架完全拧紧（参见方案 10.14）。

10.4 试剂与培养基

准备试剂和培养基的最终目标是保证其纯度：①避免混入有毒物质；②确保对试剂的组分完全了解，制备过程可重复，对各组分的功能十分清楚；③减少微生物污染的危险。

多数试剂和培养基均可以通过高压灭菌（如果加热后较稳定，如水、盐溶液、氨基酸水解产物）或膜过滤的方法（如果加热后不稳定）进行灭菌。进行高压灭菌时，溶液应分装入硼硅酸盐玻璃瓶或多聚碳酸酯瓶中，盖子要拧松以减少瓶子破裂或爆炸的可能。瓶内产生的蒸汽有助于阻止高压灭菌器产生的蒸汽进入瓶子，但瓶内液体的体积需要随后用无菌的超纯水（UPW）来恢复。如果用无菌显示仪器、无菌指示剂（如 Thermalog）和可记录式温度计的探针，则应将其放在消毒器中央的模拟样品中（参见图 4.23b）。

10.4.1 水

水的纯度可用多种不同参数来评定，包括：离子浓度，用电导率或电阻率来衡量；pH；有机物、胶体、颗粒物及细菌的含量。已经界定了 3 个级别（ISO 3696-1987），其标准也已在 Wikipedia 中提供（纯水），在 Millipore 的网站也可查询（实验室用水）。用于组织培养的水必须纯度很高，尤其对于无血清培养基（参见 4.4.2 节）。1 级水和 2 级水适合于最后冲洗玻璃器皿，灌注于水浴槽、温箱中的加湿盘，以及作为高压灭菌锅中的用水。由于水的来源不同，因此需要纯化的程度也千差万别。硬水在进入净化系统之前，需要进行常规的离子交换软化过程，但是软水就不需要这一过程。

纯化水的方法主要有 4 种：反向渗透、蒸馏、去离子和炭过滤。要获得超纯水（UPW），第一步通常是进行反向渗透，也可用蒸馏代替（图 10.9，另见图 4.22）。蒸馏的优点是水可通过加热而灭菌，但是采用这个方法要贵一些，因为要消耗电，而且加热器要经常清洗。如果第一步用玻璃容器进行蒸馏，蒸馏器应接电进行自动控制，加热装置应由硼硅酸盐制成或表面覆盖有二氧化硅。反向渗透依赖于过滤膜的完整性，所以必须对流动过程进行监控。选择反向渗透的滤筒类型主要根据所用水的 pH（参见厂商提供的详细说明）。如果用于蒸馏的电价和替换膜的费用要直接从预算中支出，那么用反向渗透会便宜一些；如果是免费提供电力或不按用量收费，则用蒸馏的方法会便宜一些。第一步产生的是半纯水（SPW），可能接近于 2 级水，可用于清洗玻璃器皿及配制一些实验试剂（图 10.9）。

第二步是炭过滤，可去掉有机或无机的胶体。第三步是在高级混合床上进行的去离子过程，以去掉离子化的无机物。第二步和第三步之后得到的是纯水（PW），可用于配制一些实验试剂，如 D-PBSA、胰蛋白酶。最后一步为微孔过滤，去掉来自系统的所有微生物，以及从去离子剂中脱落的树脂。为了最大限度地减少储存过程中的污染，应该直接从最后阶段的微孔过滤器收集水，而不储存水。如果将第一阶段处理后的供水开关关闭（如过夜），水在微孔过滤器和储存池之间进行不断地循环（图 10.9），那么储存的水会逐渐“变亮”（即纯度增高）。如此产生的超纯水（UPW）相当于 1 级水，适合于配制培养基，早晨的第一件事就是从过滤器的出水口（图 10.9 的右侧）收集水。

每隔一段时间检测水的电导率（或相反，电阻率）的变化可监控去离子水的质量，当电导率增高时，滤管就应该更换了。标准（ISO 3696-1987）规定，Ⅰ类水的标准为：在 25℃时，水的电阻率≥10MΩ/cm（电导率小于 0.1μS/cm）。总有机碳（TOC）应≤10ppb（parts per billion，见表 10.4）。电导率和 TOC 的计量器通常和纯水系统一起提供，但也可能需要另外购买（如 Hanna；GE Life Sciences，GE M9；另见图 4.22b 和见补充材料中的附录Ⅲ）。水在去离子之前可先进行蒸馏，这样可以为去离子过程提供无菌水；还可在去离子和微孔过滤之间加一步超过滤过程，这样可以产生无热源的水（Millipore）。

水可用高压灭菌法灭菌，121℃（250℉），100kPa（1bar，15lb/in^2），20min，应将水按预定目的分装（例如，分装 450mL 水，用于以 10×浓缩液配制培养基）。灭菌时要将瓶盖拧松，在瓶子冷却时再将盖子拧紧。使用之前加入无菌的 UPW 弥补蒸发量。

方案 10.5 也可用于练习 6（参见 27.2 节）。

方案 10.5 超纯水（UPW）的制备和灭菌

设备与材料

非无菌

- 有刻度的玻璃硼硅酸盐（如 Pyrex）或可消毒的塑料（聚碳酸酯）螺口瓶子（确保有足够的上部空间便于之后加液，如用浓缩液配制培养基）
- 相配的螺旋盖
- 灭菌测试器（如 Alpha Medical；Steris；Thermalog，3M，Bennett）
- 灭菌检测胶带（如 Camlab；Fisher；VWR）
- 记号笔或预先印好的标签
- 纯水设备（如 Astell；LTE；Steris；Tuttnauer）
- 灭菌锅
- 日记本（记录制备及消毒过程）或计算机数据库（表 10.5）

操作步骤

1. 在日记本或数据库中设立条目（表 10.5）；在瓶子上标明日期、容量和批号（将标签打印机与计算机相连就可自动打印出标签）。
2. 在经过过夜循环后的早晨，从纯水器中放出约 50mL 水，分别用相应的仪器测定电导率（或电阻率）和总有机碳（TOC）含量，记录在日记本上。
3. 如果水的质量达到限定的标准（在 25℃时，水的电阻≥10MΩ/cm，TOC≤10ppb），就直接收集至标注好的瓶子内。
4. 灌至一定的体积，例如，如果用于稀释 10 倍浓缩培养基就分装成 430~450mL（参见方案 10.8）。
5. 将灭菌指示器放入一个瓶子（消毒之后检查，而后丢弃这个瓶子），在每个瓶子上贴 2cm（1in）的灭菌指示胶带。
6. 用螺口盖将瓶子盖上，但要将盖子松开一圈。
7. 将瓶子摆放在灭菌锅内，将有消毒指示器的瓶子放置在中间。
8. 关上灭菌锅，检查设置：121℃，100kPa（15lb/in^2），用预真空运行 20min，不选择后真空。
9. 开启灭菌程序。
10. 在循环完成之后，检查打印出的记录，确认执行的是正确的灭菌过程，记录在本上。
11. 放置，冷却至 50℃（120℉）以下。
12. 打开灭菌锅取瓶子。
13. 瓶子的温度降到室温时将盖子拧紧。

注意事项 如果消毒过程中瓶盖被打开了，在瓶子仍然是热的时候不要将盖子拧紧，这样可能会使某些瓶盖的内垫在瓶子冷却或内容物收缩时掉入瓶子。同样，第一次打开瓶子时，空气会迅速地进入瓶子，这也会引起污染。因此，在灭菌过程被打开的瓶子，应使其在无菌环境中冷却至室温，如在拧紧盖之前将其保持在灭菌锅内或放在层流罩内。

14. 检查灭菌指示器，确认灭菌条件已经达到，记录在记录本中（表10.5）。
15. 将瓶子于室温短期存放。
16. 根据需要补充至培养室备用，通过检查灭菌指示胶带来确认瓶子是否已经经过灭菌处理。

10.4.2 纯水器的维护

通过每周检查每一个出水口的水电导率和TOC含量的记录，来制订一个定期监测纯水系统的计划，以确定它们符合设定的限制（参见表10.4）。当出现一个模式可以表明反向渗透系统、去离子装置、碳筒的预期使用寿命，就可以制订一个计划，先于状况恶化之前进行更换。同样，通过观察，也能够确定多长时间更换蒸馏器（如果使用）。清洗步骤如下。

（1）拆除玻璃热水器。

（2）用1mol/L HCl清洗，彻底冲洗干净。

（3）丢弃最初从蒸馏器出来的沸水。

（4）进行贴瓶率分析来测试最初收集的水（参见方案23.10）。

管道和连接部位也会被藻类或其他微生物污染，这种污染通常可看见，清洗方法如下。

（1）拆开连接部位，清洗管道。

（2）用热的洗涤剂浸泡。

（3）冲洗，用1mol/L HCl浸泡。

（4）用超纯水（SPW）彻底冲洗。

（5）重新安装，丢弃第一批水。

（6）用后续收集的水稀释10×浓缩培养基（参见方案10.8），以此培养基进行贴瓶率分析（参见方案23.10）来测定水的质量。

这些操作执行的频率在实验室之间是不同的，它取决于主水供应的质量，保持记录能够发现规律，一旦建立了这种模式就应当写入标准操作程序。

10.4.3 平衡盐溶液

BSS的配方设计在前面已经讨论过（参见8.3节）。Hanks的BSS配方（仿Paul，1975）中用氯化镁来代替以前推荐的硫化物（参见表8.2），进行高压灭菌时的pH应在6.5以下，这两项措施都可以预防磷酸钙和磷酸镁的沉淀，临用之前要进行中和。同理，没有添加Mg^{2+}和Ca^{2+}成分的Dulbecco的磷酸缓冲盐溶液（D-PBS）经常使用，这种情况下它被称为D-PBSA或不含Mg^{2+}和Ca^{2+}的D-PBS；本书均采用“D-PBSA”的写法。钙和镁可以单独配制成的溶液，在临用之前加入，称为D-PBSB。然而，在实践中更简单的做法是购买添加了钙和镁的D-PBS，或选择其他替代物，如Hanks'BSS。D-PBS也可用于区分Dulbecco的配方与简单的磷酸缓冲盐溶液（PBS）配方，PBS不含氯化钾，只含有等渗的氯化钠和磷酸缓冲液，不应该认为是一种平衡盐溶液。在发表的文章中，使用了哪一种配方都应该描述得很清楚。

多数的平衡盐溶液都含有葡萄糖，由于它在高压灭菌时会熔化变焦，因此在配制和灭菌过程中最好先不加，灭菌后再加上。如果葡萄糖为100×浓缩液（200g/L），则在高压灭菌时熔化变焦的现象会减少，每升BSS加5~25mL，即含有1~5g的葡萄糖。作为选择，含有葡萄糖的完全平衡盐溶

液可用于配制完全限定成分的培养基（参见方案 10.8），这种溶液要通过过滤来除菌（参见方案 10.10~方案 10.13）。方案 10.6 用于配制 D-PBSA，这种溶液通常用作清洗液，还可用于溶解胰蛋白酶或乙二胺四乙酸（EDTA），当然也可用任何一种不含葡萄糖和碳酸氢钠的 BSS 的配制（可作为培训，见第 27 章练习 7）。

方案 10.6　D-PBSA 的配制和灭菌

概要

不断地搅拌将干粉溶解，调整至终体积，检测 pH 和电导率，按预定量分装，进行高压灭菌。

材料

非无菌

- D-PBS 干粉（溶液 A，不含 Ca^{2+}和 Mg^{2+}，如 Sigma D5652）或药片（Oxoid）
- 超纯水（UPW；见 10.4.1 节）
- 容器：干净的、底部有出口的玻璃或塑料抽吸器，或有蠕动计量泵，如 Perimatic（Thomas Scientic；VWR）和管子（参见图 4.6）的 Erlenmeyer 烧瓶或瓶子
- 磁力搅拌器及其 PTFE 包裹的搅拌子
- 储存用的瓶子，有刻度；硼硅酸盐玻璃
- 电导率测量仪或渗透压计
- pH 计
- 高压灭菌胶带（Alpha Medcal；Camlab；Fisher；VWR）或无菌指示标签（Steris）
- 高压灭菌器
- 日记本或访问计算机数据库

操作步骤

1. 在容器中加入超纯水。
2. 将容器放到磁力搅拌器上，转速设定为 200r/min 左右。
3. 打开 D-PBS 干粉的包装或取出适当数量的药片，慢慢地加入容器中，边加入边搅拌。
4. 一直搅拌到干粉完全溶解。
5. 检测样品的 pH 和电导率，并做记录。
6. pH 的变化不应超过 0.1 个单位（不同的配方 pH 可能不同）。
7. 电导率的变化不应超过 150μS/cm 的 5%。也可选择测定渗透压（或都测），每批之间应该显示类似的电导率。

注意事项　作为一项质量控制方法，检查这些参数了解电导率，以确保配制过程没有错误是非常重要的。对培养基的任何调节（如渗透压）都必须在进行了质量控制之后进行。

8. 丢弃测量用样品，不要加回到原液中。

9. 将容器中的液体分到有刻度的瓶子中。
10. 盖好瓶盖，密封。
11. 贴一小片高压灭菌胶带或无菌指示标签，并写上日期。
12. 将密封的瓶子放到灭菌器中，高温高压灭菌：121℃（250℉），100kPa（1bar，15lb/in^2），20min。
13. 室温保存溶液。
14. 完整记录在日记本或计算机数据库中。

10.4.4 培养基的配制与灭菌

制备培养基时，最初的培养基被看作基础培养基，通常有明确的配方，在实验室配制或购买，在添加了 $NaHCO_3$、谷氨酰胺和血清等物质后，称为完全培养基。这些术语并没有绝对的定义，它们是依据你如何配制来定义的。

在配制复杂溶液的时候要十分小心，要保证所有成分均溶解，在灭菌过程中不会被过滤掉，在高压灭菌后或储藏时仍处于溶解状态。配制浓缩的培养基通常要将 pH 调得很低（为 3.5~5.0），以保证所有成分呈溶解状态，即使这样还可能产生沉淀。如果某种物质属正常再悬浮状态，通常可在稀释时溶解；但如果沉淀是由于培养基中的某种成分降解而形成，培养基的质量可能会下降。如果有沉淀形成，则可通过细胞生长、克隆化培养和相应的特殊功能实验对培养基进行检测（参见 10.6.3 节），或替换培养基。

商用培养基可提供：①工作浓度溶液（1×），含或不含谷氨酸盐，Na_2CO_3 的浓度依据气相中所用 CO_2 的浓度来决定；②10×浓缩液，通常不含 $NaHCO_3$ 和谷氨酸盐，$NaHCO_3$ 和谷氨酰胺通常有单独的浓缩液；③干粉培养基，含或不含 $NaHCO_3$ 和谷氨酸盐。干粉培养基最为便宜，用它并不比用自己的化学物质配制培养基贵多少，因为自行配制需要花费购买高纯度原料的费用，需要花费配制、灭菌、质控的时间，以及电力和工资等日常开支。干粉培养基的质控由厂商来做，通过检测促进细胞生长的特性来进行，当然不包括无菌质控。干粉培养基是充分混合的，所以理论上一包粉可分多次使用。然而，在实际应用中要尽量选择与所用量相匹配的包装，因为包装一旦打开，组分会损坏或凝固。

用 10×浓缩液配制工作培养基，每升的价格大约是用干粉配制培养基价格的 3~4 倍，但这样可节省时间、节省灭菌和质控的费用。直接购买工作浓度培养基是最贵的（是 10×浓缩液价格的 3~4 倍），但最方便，除了可能按需要加入血清及谷氨酸盐，不需要其他的配制工作。总而言之，1×的培养基易于使用，但比较贵；10×培养基可以允许对配方有所更改，包括其他添加物，如非必需氨基酸。干粉培养基最便宜，但要花费较多的配制时间和能源费用。

用 1×储存液配制完全培养基　方案 10.7 描述了用 1×储存液配制完全培养基的操作过程（可作为培训练习，见第 27 章练习 8）。“材料”中给出的体积是最小量，需要用移液管吸出你所需要的量；“操作步骤”中是指定的实际量。

方案 10.7　用 1×储存液配制培养基

概要

检查配方，如果含有谷氨酰胺和 Na_2CO_3，在加完需要的血清之后可直接使用（参见 8.6 节）；如果

配方缺少谷氨酰胺和 Na_2CO_3，则必须加入相应的浓缩液。

注意事项 加入培养基的补充成分（如血清或抗生素）并不包含在最初的配方中，这必须在发表文章时有简要的说明。其他加入的添加剂（如谷氨酰胺或 $NaHCO_3$）是配方的一部分，而不是补充物，就不需要在发表文章时进行说明，除非浓度有变化。可能需要在使用时记录下浓度但不需要询问供应商，这意味着添加了配方指定量之外的量。

材料

- 吸液管等，如无菌操作技术表格中所列（参见方案 5.1、方案 5.2）
- 培养基储存液，如用 Hanks 的盐溶液配制的 Eagle's MEM，1×100mL
- 谷氨酰胺，200mmol/L（需要解冻）2mL
- $NaHCO_3$，7.5%（0.89mol/L）3mL，如果不曾添加
- 血清：新生牛血清或胎牛血清（需要解冻）12mL
- 抗生素（如果需要就使用，不推荐常规使用）
- 青霉素溶于 BSS 或 D-PBSA，10 000U/mL 1mL
- 链霉素溶于 BSS 或 D-PBSA，10mg/mL 1mL

操作步骤

1. 检查培养基的配方，并决定需要添加何种添加剂，如谷氨酰胺和（或）$NaHCO_3$。
2. 将培养基及需要加入的其他补充物或添加剂放在超净台内。
3. 去掉所有外包装，用 70%乙醇擦洗瓶子。
4. 将瓶子打开。
5. 将适量的各种添加剂加到储存瓶中，并做正确稀释。
   (a) 谷氨酰胺，200mmol/L　1mL
   (b) 青霉素　0.5mL
   (c) 链霉素　0.5mL

注意：抗生素不推荐使用，仅在高风险时使用，如原代培养。

6. 加入 $NaHCO_3$，如果不曾添加。
   (a) 以 Hanks 盐溶液为基础的 MEM（材料中所指定的）　0.45mL
   (b) 以 Earle's 盐溶液为基础的 MEM（见下列注意事项）　2.6mL
7. 如果 $NaHCO_3$ 的终浓度是 23mmol/L，就如步骤 6（b），之后将含有 5% CO_2 的气体充入培养基。小心地将 CO_2 轻轻充入培养基，这样气泡就不会溅到瓶颈处。不要向含有血清的培养基中直接充气，因为培养基起泡将从瓶颈处溢出，污染的危险性增大。
8. 加入血清达到最终需要的浓度，如 10%，应该是 11mL 血清加到 100mL 培养基中。
9. 将瓶子盖好。
10. 加完一种添加剂后将其移到超净台的一侧，这样就知道已经加了哪种添加剂。
11. 培养基配完后，将所有的添加剂和补充物从超净台上拿走。
12. 修改标签，在瓶子上记录添加剂、日期并签名。
13. 将培养基保存在 4℃或直接使用。
14. 如果是第一次使用一种新的培养基，要吸出一些放在培养瓶或培养皿中，在你的标准条件下培

养至少1h（最好过夜），确认pH处于正确的水平。如果有问题，要用1mol/L的HCl或1mol/L NaOH调整培养基的pH，再次温育，重复上述过程。

15. 一瓶培养基尽量用于一种细胞系，在瓶子上做相应的标注，不要用于任何其他细胞系。

注意事项 往培养基里添加一种物质时，下列公式可用于计算稀释量：

要求的浓度/起始浓度×需要的体积

所以，要从7.5%的储存液（0.89mol/L或890mmol/L）稀释至终浓度4mol/L，即

$$4/890 \times 100 = 0.45\ (mL)$$

稀释至23mmol/L，即

$$23/890 \times 100 = 2.6\ (mL)$$

用浓缩液配制完全培养基 用10×浓缩液配制培养基是一种折中的好方法，其经济性和便捷性介于使用以干粉配制培养基（参见方案10.9）和使用1×工作液（参见方案10.7）之间（可作为培训练习，见27.3节练习10）。与方案10.7相同，“材料”中给出的体积是最小量，需要用移液管吸出你所需要的量；“操作步骤”中是指定的实际量。假设实验需要使用较大批量的培养基，用10×浓缩培养基配制，操作步骤所指定的最终体积是500mL，你可根据需要按比例改变。完全培养基的配制量应设定在3周内使用完。

方案10.8 用10×浓缩液配制培养基

概要

要配制完全培养基时，准备几个盛有无菌去离子蒸馏水的容器，一个容器的容量至少要够用1~3周。加浓缩培养基和其他成分，调整pH，直接使用或放回冰箱。

材料

- 吸液管，其他设备如无菌操作技术表格中所列（参见方案5.1、方案5.2）

无菌

- 预先分装好的UPW 450mL
- 培养基，10×浓缩液，如用Hanks或Earle盐溶液配制的Eagle's MEM 52mL
- 谷氨酰胺（需要解冻），200mmol/L 6mL
- $NaHCO_3$，7.5%（0.89mol/L）20mL
- 牛血清，新生牛血清或胎牛血清（需要解冻） 52mL
- 抗生素，如果需要就使用（不推荐常规使用）
- 青霉素，10 000 U/ML 6mL
- 链霉素，10mg/ML 6mL
- HEPES（如果需要；仅适合于低$NaHCO_3$），1.0mol/L 6mL

- NaOH，1mol/L（如果需要） 10mL

操作步骤

1. 将血清和谷氨酰胺解冻，置于超净工作台内。
2. 所有曾放入水浴锅或冰箱的瓶子都要擦干净后再放入超净台。
3. 取 10×浓缩培养基，用无菌的超纯水 1∶10 稀释。 50mL
4. 加入 200mmol/L 谷氨酰胺，1∶100 稀释。 5mL
5. $NaHCO_3$
   （a）Hanks 盐溶液配制的 MEM，于空气气体环境下培养； 4.5mL
   （b）Earle 盐溶液配制的 MEM，于 5% CO_2 气体环境下培养；13mL
6. 加入 HEPES，如果需要增加缓冲能力：

终浓度为 10mmol/L（1mol/L 浓缩液，1∶100 稀释），适合于 Hanks 盐溶液 MEM。这种情况允许培养瓶排出气体，因为某些细胞系在高密度生长时会产生很多酸性物质；5mL

或

终浓度为 20mmol/L（1mol/L 浓缩液，1∶50 稀释），适合于 Earle's 盐溶液配制的 MEM，而且只能加 4.5mL $NaHCO_3$，如步骤 5（b），如果在 2% CO_2 气体环境下培养，加 10mL。

注意事项 如果加入 HEPES，要检测渗透压；可能必须添加水，营养成分被稀释是次要的。

7. 加入 1mol/L NaOH，使 pH 达到 7.2（20℃），孵育之后培养基的 pH 将上升至 7.4（37℃），但如果是第一次使用的配方，这个数值可能还需要通过滴定实验来检验（参见方案 10.7，另见 27.3 节练习 10）。

如果需要加入其他成分，而这些成分是用水配制的，则加入前应先从已准备好的水中取出相同体积的水；如果这些成分溶解在等渗盐溶液中，则只要加入至终体积。因为血清是等渗的，所以血清也是加入至终体积，尽管这样做会稀释培养基的营养成分。无论是哪个程序，这都是一致的。

要在 37℃平衡和检测 pH，因为随着温度的增高 CO_2 的溶解度会降低，HEPES 的 pK_a 也会发生变化。

调节 pH 用于中和 10×浓缩培养基（其成分的溶解度用酸来维持）的碱用量也会由于培养基的批次及种类的不同而有差异，在实际应用中，要在 37℃将培养基的 pH 调到 7.4 有些困难。当第一次配制一种新的培养基时，应加入规定量的 $NaHCO_3$，在合适的气体状态下，将加入不同碱量的样品放在 37℃平衡过夜，次日清晨检测 pH，选择正确的碱用量，以此来配制其余的培养基。

碳酸氢钠 要与大气 CO_2 建立稳定的平衡，重要的是碳酸氢盐的浓度，而不是所用碳酸氢盐的量，如果培养基在 37℃、pH 7.4 的条件下，每一 CO_2 浓度都有相应的碳酸氢盐的浓度，这在前面已有阐述（参见 8.2.2 节和表 8.1）。一些培养基是为使用高浓度碳酸氢盐和高浓度 CO_2 而设计的（如含 Earle 盐溶液的 Eagle's MEM），而其他一些培养基则含低浓度碳酸氢盐，适用于空气的气相条件（如含 Hanks 盐溶液的 Eagle's MEM；见表 8.1 和表 8.2）。如果要改变培养基，其碳酸氢盐的浓度也要改变，此时确保渗透压仍然在可接受范围内是非常重要的。当不按原始配方配制培养基时，应时刻检测渗透压（参见 8.2.5 节）。

培养基的附加物 如果培养基的消耗量特别大（每年超过200L），并且正在购买现成的培养基，最好能够获得配方中的附加成分，因为这样做会相对便宜一些。尤其是HEPES，单独购买价格非常高。谷氨酰胺经常单独提供，因为它不稳定，最好单独购买后冷冻保存。4℃时培养基中谷氨酰胺的半衰期大约为3周，37℃时为3~5天。一些谷氨酰胺二肽的稳定性增高（如Life Technologies公司的Glutamax），同时保持了谷氨酰胺的生物活性。

质量控制 如果已经对一批培养基的促生长和其他特性进行了检测，并且结果非常满意，那么在配制工作液时，不需要每次再进行检测。但是，要检测由10×浓缩液稀释的培养基是否无菌，则于用前将配好的完全培养基的样品放到37℃温育48h（参见10.6.2节）。

干粉培养基 每个包装上都有干粉培养基的配制说明。最好选择一次能全部配制的包装，并在3个月内用完。选择没有谷氨酰胺的配方，如果有其他不稳定成分，也应该先不加，在用之前以无菌浓缩液的形式加至培养基中。虽然BSS可用高温高压的方式灭菌（参见方案10.6），但这要求其中不含葡萄糖和碳酸氢钠。如果要对完全的BSS进行灭菌，可按下列干粉培养基的配制方案操作（方案10.9）。这个方案在培训练习部分也有（参见27.3节练习6）。

方案10.9 以干粉配制培养基

概要

用适量的超纯水将包装中的干粉全部溶解；将容器放到磁力搅拌器上，逐步加入干粉，不断地搅拌。当所有的成分完全溶解后，培养基应立即过滤不能放置，否则会产生沉淀或有微生物污染。所有成分（如谷氨酰胺、$NaHCO_3$或血清）都加完后再调整pH。

设备与材料

无菌

- 装培养基的有刻度瓶子，500mL 20个
- 瓶盖20个
- 用于污染控制取样的普通容器2个

非无菌

- 超纯水10L
- 干粉培养基，如Earle盐溶液配制的MEM，不含谷氨酰胺，10L包装
- 有刻度的Erlenmeyer烧瓶或瓶子，有足够的上部空间，10L 1个
- 磁力搅拌器（如Bellco；Cole Parmer；Techne）及用PTFE包裹的搅拌子（如VWR），50mm，各1个
- 电导率计量器（如Hanna；Omega）

操作步骤

1. 在容器中加入超纯水9.5L。

2. 放入磁力搅拌子。

3. 将容器放到磁力搅拌器上，设定转速为200r/min。

4. 打开干粉的包装，将干粉慢慢地加入容器中，边加边搅拌。用超纯水冲洗，确保所有成分无损失。

5. 一直搅拌到干粉完全溶解（不加热）。

6. 用超纯水加至10L。

7. 用过滤法灭菌（参见10.5.2节，方案10.10~方案10.13），分装成500mL或450mL（之后如果要添加血清）。

8. 将瓶子盖好后密封。

9. 4℃保存。

10. 加入谷氨酰胺和Na_2CO_3（如果不曾加过），以及血清（如果需要），临用之前将pH调到7.4。

如果培养基用量很少（每周少于1.0L）或同时用几种类型的培养基，操作者可配制少量完全培养基，加入谷氨酰胺和Na_2CO_3后直接用瓶顶除菌过滤装置或过滤瓶（参见10.5.2节和方案10.12）过滤至储存瓶中。用这种过滤装置或其他负压过滤器，在过滤过程中会使溶解的CO_2丢失，导致pH升高，因此可能需要在瓶子的上部空间通入5% CO_2气体。如果培养基中$NaHCO_3$的含量正确，并与一定的气体条件相适应（参见8.2.2节），培养基在温箱中就会重新达到平衡，这应在第一次使用该培养基时就进行确认。

培养基用量大时（每周超过10L），应使用蓄压容器配制，并用一个大吸管不断取样检查，看溶液是否完全溶解，之后用连线式一次性过滤器或可重复使用的过滤器进行正压灭菌，最后收集到容器中（参见10.5.2节，方案10.13）。

10.5 培养基的灭菌

10.5.1 可高压灭菌的培养基

一些厂商可提供能高压灭菌的Eagle's MEM培养基（如Life Technologies）和其他培养基（Sigma-Aldrich）。与过滤相比，高压灭菌的工作强度小、相对便宜、失败率低。厂商会提供该过程的说明，这与前面所述的D-PBSA相似（参见方案10.6）。这类培养基可用琥珀酸盐调pH至4.25，这样可以保证B族维生素在高压灭菌期间的稳定性，灭菌后再进行中和。谷氨酸盐或谷胱甘肽可代替谷氨酰胺，或在培养基高压灭菌之后加入无菌的谷氨酰胺。不含葡萄糖的BSS可高温高压灭菌，各种氨基酸水解液，如胰蛋白胨磷酸盐肉汤及其他微生物培养基也可高温高压灭菌。

10.5.2 除菌过滤

对于具热不稳定性的溶液的灭菌可以采用0.1~0.2μm孔径的微孔滤膜进行过滤（图10.10~图10.14）。有许多滤膜可供选择，它们由不同的材料制成，包括聚醚砜（polyethersulfone，PES）、尼龙、多聚碳酸盐、乙酸纤维素、硝酸纤维素、PTFE、陶瓷。从大小外形上看，有注射器连线式过滤器（图10.11a、b）、小型和中等大小连线式过滤器（图10.11c、d，图10.12）或烧瓶、瓶顶式过滤器（图10.11e、f），以及多碟式、筒式过滤器（图10.13）。多数厂家（如Durapore、Millipore）

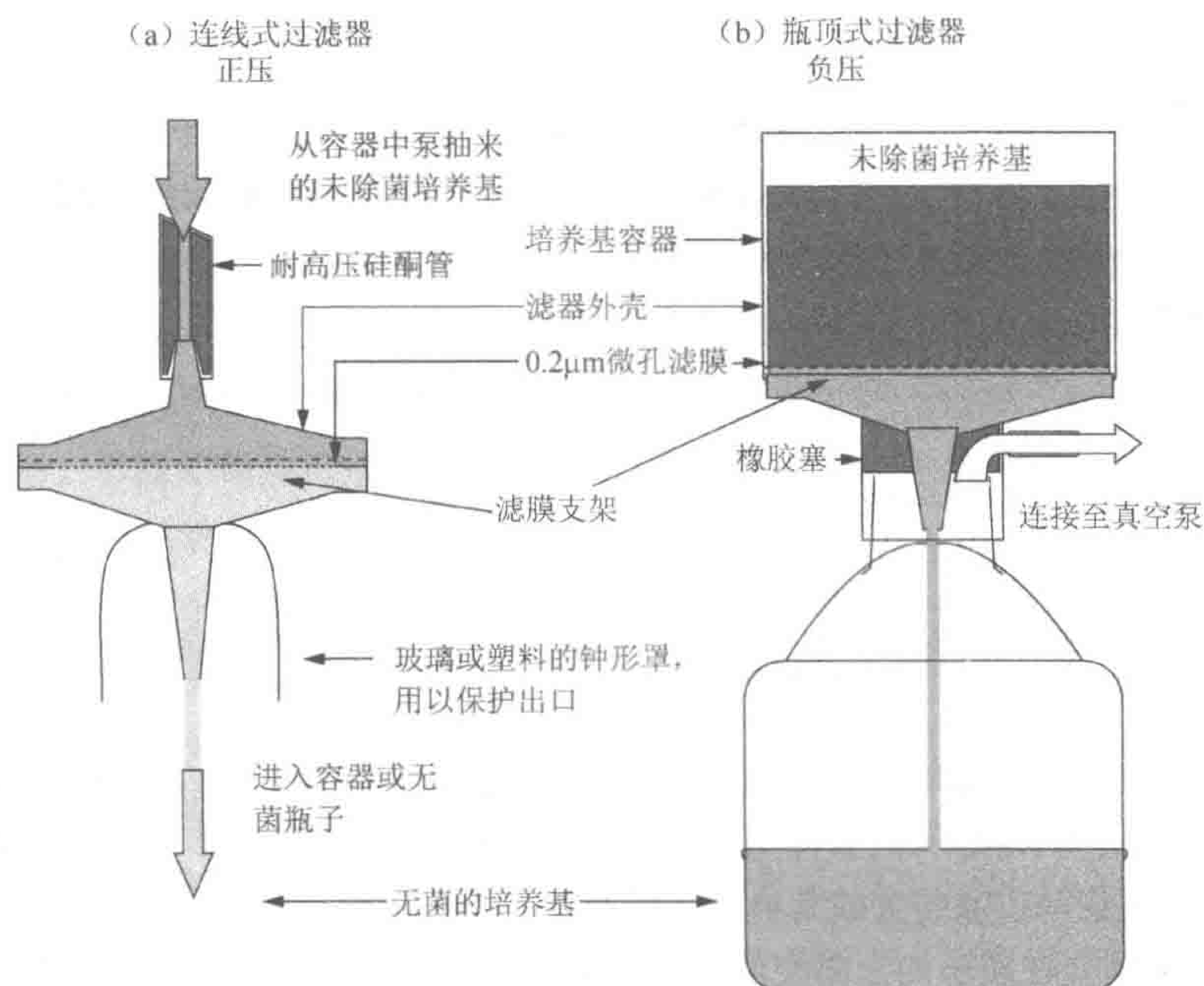


图 10.10　无菌过滤。（a）连线式过滤器，未除菌培养基来自蠕动泵（图 10.12）或压力容器（图 10.13）；（b）瓶顶式过滤器或三角瓶过滤器（设计相似）与真空泵相连。将培养基从容器上部注入，并在下面收集，下面的容器也可作保存使用

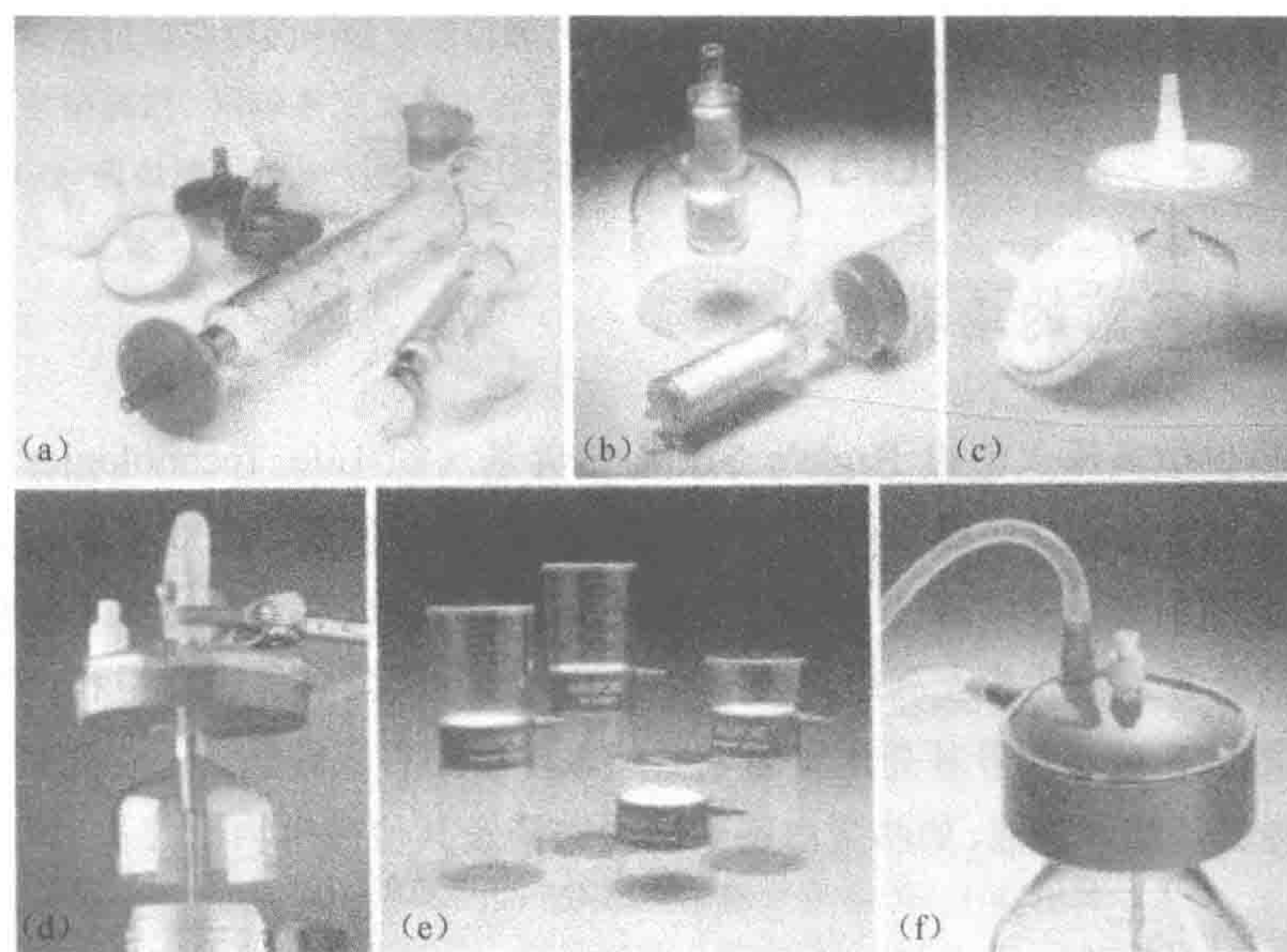


图 10.11　一次性除菌过滤器。系列 Millipore 除菌滤器：（a）Millex25mm 盘式注射器过滤器；（b）Sterivex 高容量过滤器，有鲁尔接口，可通过软管连接；（c）Millex50mm 连线过滤器，有钟罩和无钟罩的；（d）Steripak 有钟罩的大型连线式滤器（使用时放下钟罩，盖住瓶口）；（e）带储存瓶的 Strericup 过滤器，还可选择 Stericap 瓶顶式过滤器；（f）瓶顶式过滤器，培养基来自分离的容器（图 10.10 带一个内嵌式容器）。（a~d）正压；（e，f）负压。图片由 Millipore（UK）有限公司提供

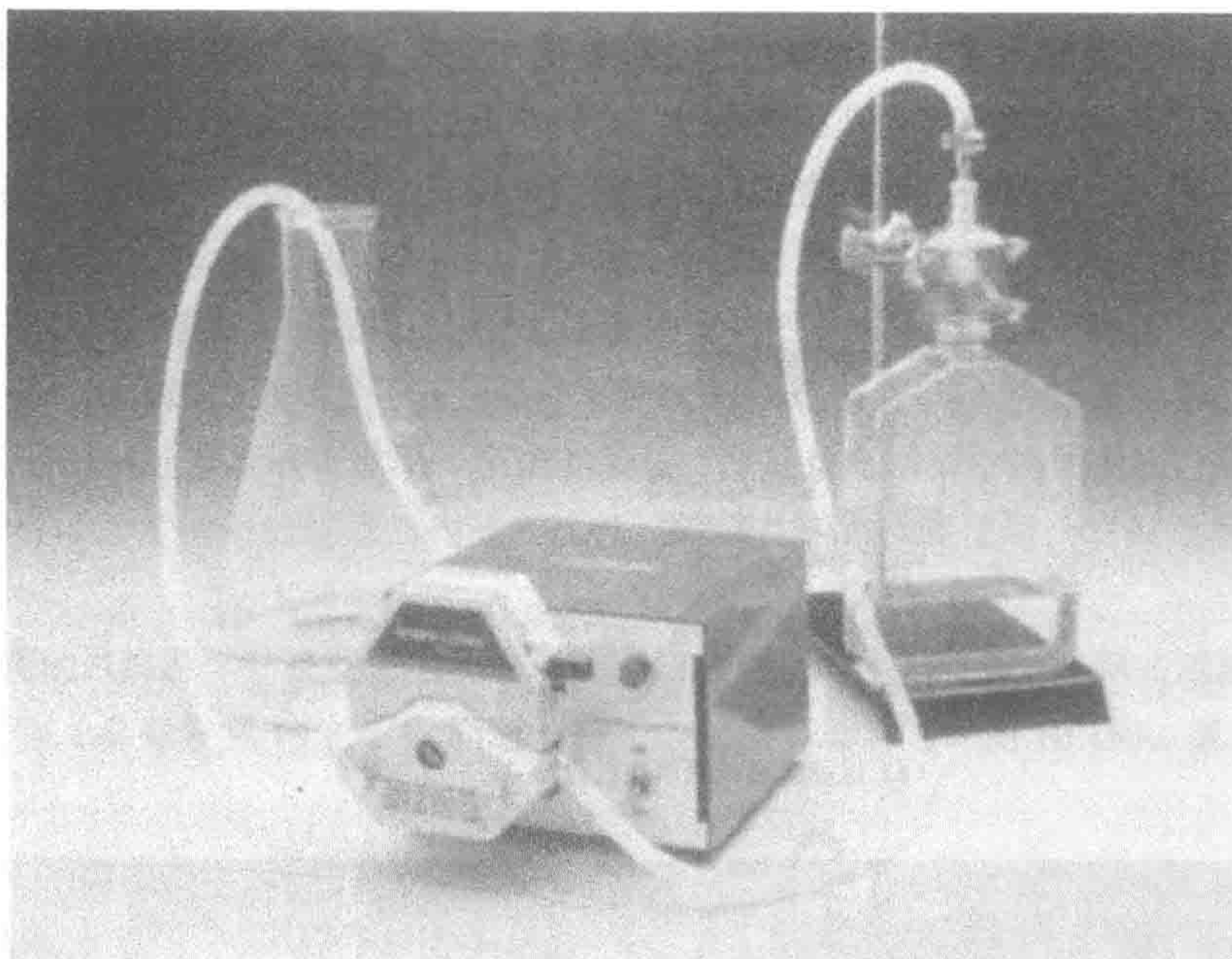


图 10.12 蠕动泵过滤器。非无菌储存器和无菌过滤器之间有蠕动泵相连进行除菌过滤［照片由 Millipore（UK）有限公司提供，这个装置 Millipore 不再提供，已转给 Millipore Mobius FlexReady，将它设计用于大批量过滤，但会改用不同的蠕动泵］

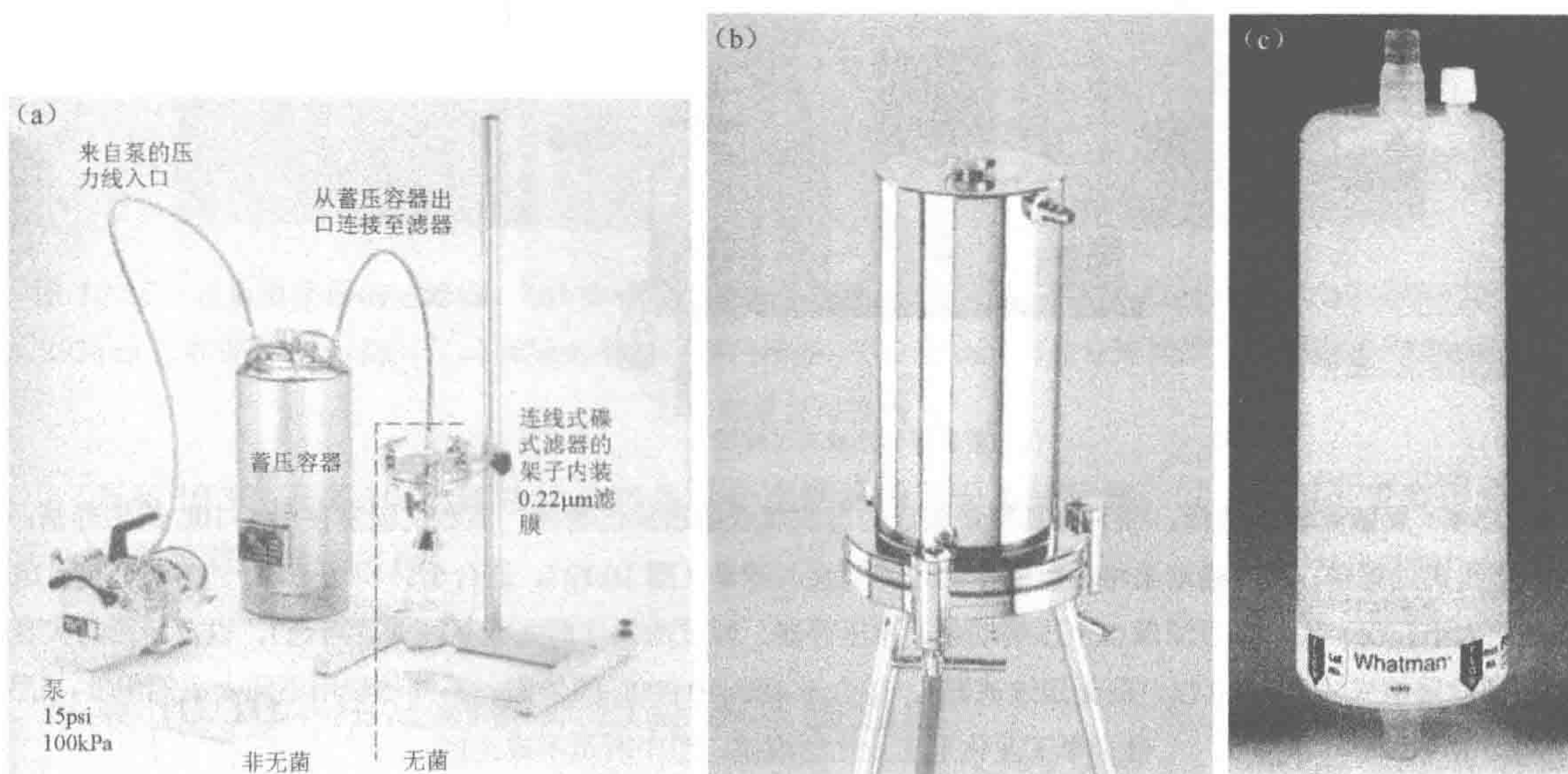


图 10.13 大批量连线式过滤装置。（a）连线式过滤装置由一个蓄压容器（中间）通过一个无菌的、可重复使用的 142mm 滤器与一个接收瓶（右边）相连。用一个出口带水龙头装置的大容器可以收集来自蓄压容器的全部液体，之后再分装至无菌容器中（图 10.14c），只有过滤装置和接收瓶需要灭菌；（b）过滤器架子上安一个筒式滤器代替（a）中的碟式滤器用于大批量除菌过滤，或用于预过滤（图 10.14c）（Sartorius Steddim 提供）；（c）一次性筒式过滤器，用于预过滤或除菌过滤，依据孔隙度决定（Whatman 提供）

提供的低蛋白结合过滤膜非常实用；PES过滤膜流速比较快，多聚碳酸盐膜是绝对的滤膜，其内整齐排列着许多孔径均匀的孔；当孔径变小时，每一单元的孔数会增加，以维持流速。许多其他滤膜的网孔大小不同，都是通过截流方式过滤，它们一般流速都比较快，这样可以减少堵塞，但需要在高压下进行。



图 10.14 灭菌滤器的选择。（a）与真空泵相连的过滤瓶或瓶顶式过滤器；多数实验室使用1~10L的培养基；（b）连线式过滤器，通过蠕动泵将大容器中的培养基泵入滤器（图10.12），适合于体积达100L的溶液，要考虑滤膜的大小；（c）大容量过滤器由正压蠕动泵、蓄压容器、预过滤器（筒式或多碟式，可选），以及最后的大容量除菌滤器组成（见图10.13，但无预过滤器），适合于100~10 000L的体积，不同体积用不同大小的组件，适合于半工业化至工业化的规模。图中所示不成比例

过滤可采用负压或正压（图10.10、图10.11），通过一个蓄压容器（图10.13）或一个蠕动泵（图10.12）来进行。根据过滤的量选择过滤的方式及使用哪种泵更有效，是真空泵，还是蠕动泵，或是正压（图10.14）。使用压力瓶的高压过滤要比使用蠕动泵快，但需要一个收集容器，因为流速不易调节，而蠕动泵在收集过程中可随时开关。高压还可导致滤器压缩变紧，不适合黏性溶液，如血清。负压过滤通常较简单（图 10.10b、e、f），尤其是少量操作，过滤后的溶液可直接收集在储存瓶中，然而由于CO_2的逸出，这种方法可能会使培养基的pH升高。

一次性过滤器 一次性过滤装置包括简单的碟式过滤器、中空过滤装置和筒式过滤器（图10.11）。注射器式过滤器通常用于低容量过滤（2~100mL），直径大小为13~50mm（图10.11a）。中等大小过滤器（50mL~5L）可采用连线式与蠕动泵一起使用（图10.12），或用于使用真空管和常规培养基瓶的瓶顶式过滤（图 10.11f）。中等大小过滤器也可成为一个完整的过滤装置与真空管相连，上面的空间用于储存未除菌的液体，下面的空间用于收集无菌液并保存（图10.11e）。大容量的筒式过滤器（20~500L）通常用于正压条件下连线式的操作，它与一个储蓄容器相连（图10.13），储蓄容器可用于配制培养基或可以用一个培养基袋（参见补充材料中的附录III，另见图10.6）衬在里面。尽管与可重复使用的过滤器相比一次性过滤器比较贵，但使用一次性过滤器耗时短且失败率低。

可重复使用的过滤器 可重复使用的滤器外壳可安装膜（图10.13a）或筒式滤器（图10.13b），可高温高压灭菌（参见方案10.4）。它们通常与一个蓄压容器相连（图10.15），或与蠕动泵相连，依靠正压操作。

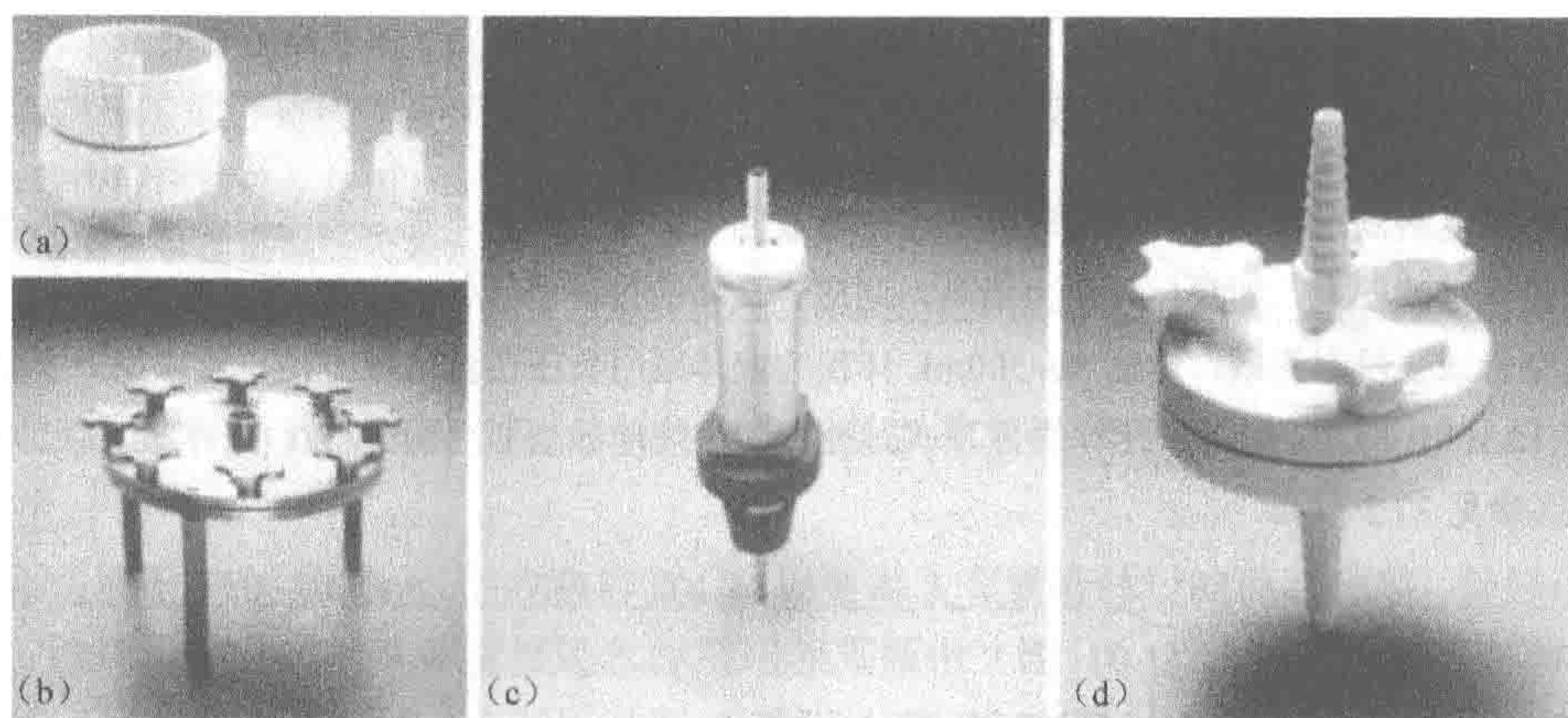


图10.15 可重复使用的过滤器。（a）Swinnex聚丙烯塑料滤器，连线式，带Luer接口；（b）不锈钢外壳，293mm大容量碟式过滤器；（c）47mm有接收器的滤器；（d）47mm有软管连接的连线式滤器（Millipore，UK有限公司提供）

方案10.10~方案10.13描述了使用各种一次性滤器用于少量过滤，以及使用可重复用滤器用于大容量过滤的操作过程。

方案10.10 用注射器式过滤器除菌过滤

概要

用注射器吸取溶液，与滤器相连，推注射器使液体通过滤器流入无菌容器中。

材料

无菌

- 塑料注射器，10~50mL容量

- 注射器式过滤器
- 接收容器（如普通容器）

非无菌

- 待灭菌的溶液（5~100mL）

操作步骤

1. 擦洗罩子和包装材料。
2. 将注射器装满待灭菌的溶液。
3. 打开收集容器的盖子。
4. 打开过滤器的包装，将其与注射器的尖端相连，连接时用包装的下半部来固定灭菌过滤器。
5. 将溶液通过过滤器排到收集容器中，只需轻轻用力。
6. 盖好收集容器。
7. 弃去注射器和过滤器。

注射器可反复装满溶液几次，装的时候将过滤器放回无菌包装的下半部，与注射器分离，再次装满注射器，再连接到过滤器上。如果反弹压力增高，则应更换新的过滤器。

如果真空管或泵没有问题，过滤 50~500mL 体积的液体采用负压过滤法很方便，可以用一个整体的过滤烧瓶（图 10.10b、图 10.11e）或用一个瓶顶式过滤器和常规培养基瓶（图 10.11f）。方案 10.12 可与练习 6 结合使用（参见 27.2 节）。

方案 10.11　用真空过滤瓶除菌过滤

概要

将真空泵与出口连接，在过滤器的上部加入培养基，打开真空泵，液体流入下部容器中；加盖，储存。

材料

无菌

- 过滤瓶（图 10.10b、图 10.11e，表 10.6；如 Merck Millipore；Corning）
- 下部容器的盖子（如果该容器用于保存）
- 用于无菌检测的样品管或普通容器

非无菌

- 待灭菌培养基
- 真空泵或真空管
- 用于连接真空泵或真空管与滤瓶接口的厚壁连接管

操作步骤

1. 将待灭菌的培养基和过滤瓶放入层流洁净台中。
2. 将过滤瓶的侧臂出口与真空泵相连（真空泵在层流洁净台的外面，如放在地上）。
3. 打开瓶盖，将过滤器顶部容器的盖子打开。
4. 将待灭菌培养基倒入顶部的容器中。
5. 打开泵。
6. 将下面容器的盖子打开，准备使用。
7. 当液体全部流入下面的容器后，将泵关掉，拆掉过滤装置和顶部的容器。
8. 从下面的容器中取出10mL样品放入一个普通容器或试管中。
9. 往下面容器和普通容器的上部空间充入5%的CO_2气体。
10. 将下面容器和普通容器盖上盖。
11. 在下面的容器和普通容器上写上培养基的名称、日期、签名。
12. 将下面的容器保存于4℃，备用。
13. 将10mL装在普通容器中的样品置于37℃孵育一周，检查是否污染，在不能确定没有污染之前不能从容器中取出培养基使用。
14. 过滤及无菌检测之后都要做记录。

一般来说，这种过滤方法污染的危险性很低，所以有了操作经验之后也许可以不需要取样进行污染检查。

过滤瓶适用于150~1000mL的收集容量。如果要对大容量液体过滤而后分装，最好用一个瓶顶式过滤器，这样可使过滤的液体直接进入标准培养基瓶中（图10.11f，也可用带上部容器的）。正压过滤也是一种选择，可使用一个蓄压装置（参见图10.13）或一个蠕动泵（参见图10.12），将它们与一个灭菌的连线式过滤器或筒式过滤器相连，再配上一个钟形罩以保护收集的容器免受污染（图10.10，图10.11b、c）。方案10.13使用的是一个小型的连线式过滤器，可与练习6联合应用（参见27.2节）。

方案10.12 用小型连线式过滤器除菌过滤

概要

通过蠕动泵将培养基从容器中泵入灭菌滤器，分装收集至瓶中。

材料

无菌

- 带罩的连线式过滤器（图10.11c、d），如47mm
- 有刻度的培养基瓶，铝箔包裹，干热灭菌（参见方案10.1）

- 盖子，高温高压灭菌（参见方案10.3）
- 用于无菌检测的样品管或普通容器

非无菌

- 待灭菌的培养基（参见方案10.9）
- 蠕动泵（参见图10.12），最好有底部开关
- 硅树脂管，与蠕动泵相配，接至滤器接口
- 固定滤器用的架子

操作步骤

1. 将设备适当擦拭放入层流洁净台中。
2. 将管与蠕动泵相连。
3. 将上游端插入待过滤的培养基中。
4. 打开过滤器包装，与蠕动泵出口相连。
5. 将过滤器夹在架子的合适高度，使收集培养基的瓶子正好位于过滤器的下方，瓶颈可被盖住，并且当装满的时候可以很容易地将瓶子取出。如果需要，可先用一个无菌培养瓶进行调试，但最后不要用这个瓶子收集无菌的液体。
6. 打开泵，收集约20mL于瓶中用于调试。
7. 取出调试的瓶子，盖上盖，标记上“1”。
8. 将第一个培养基瓶的铝箔拿掉，放在过滤钟罩下。
9. 打开泵。
10. 灌入瓶中至标记线。
11. 关闭泵。
12. 将瓶子取出，盖好，编号，换一个新的无菌培养基瓶。
13. 重复步骤7~11，每个瓶子中都装至标记线，剩余的收集在最后一个瓶子中。
14. 在每个瓶子的上部空间充5% CO_2气体，如果培养基含有高浓度的$NaHCO_3$。
15. 将铝箔重新包在盖子上，包到瓶颈处以保证保存时无尘。
16. 在瓶子上贴标签，标注日期，签名。
17. 将装有培养基的瓶子保存于4℃（参见10.6.4节）。
18. 将第一个和最后一个瓶子盖好置于37℃，孵育一周（参见10.6.2节）。
19. 完成记录。
20. 将培养基存放于4℃，无菌检测完成之前不要使用。如果在检测样品中发现污染，则整批培养基要重新过滤或丢弃。

采用正压过滤可通过增加滤器的规格及收集容器的规格来调节过滤的量。给培养基容器加压形成蓄压瓶可以代替蠕动泵（图10.13a）。方案10.13适合于过滤50L以上的量，但要增加至工业生产的规模就要选择合适的蓄压瓶和滤器，常用有皱褶的筒式过滤器或其他多表面圆柱形过滤器（图10.13b）。

方案 10.13　用大型连线式过滤器除菌过滤

概要

将培养基从压力瓶中泵入灭菌滤器，进入带出口的无菌容器中，分装至储存瓶中。

材料

参见图 10.13、图 10.14

无菌

- 过滤器（如 90mm 膜和可重复使用的过滤器支架，见方案 10.4，表 10.6，图 10.13a，图 10.15b、d），或一次性碟式过滤器（如 Millipore Steripak，图 10.11d），或筒式过滤器（如 Whatman Polycap，GE Life Sciences，图 10.13c）
- 过滤后的接收容器，底部有出口安着硅树脂管，用于分装的玻璃钟罩，位于接收容器出口的弹簧夹或阀门
- 硅树脂管，连接过滤器出口至无菌接收容器
- 培养基瓶，铝箔包裹，干热灭菌（参见方案 10.1）
- 培养基瓶的盖子，高温高压灭菌（参见方案 10.3）

非无菌

- 蓄压瓶，5~50L
- 泵，100kPa（15lb/in^2）
- 保护滤器的夹子和夹子架（除非滤器架子有腿）、出口钟罩
- 连接泵至压力瓶及压力瓶至过滤器的耐压管

操作步骤

1. 将灭菌滤器架子及接收容器放在层流洁净台内，将压力瓶放在地上或洁净台旁边的工作台上，但不要放入洁净台内。

2. 打开过滤器、接收容器的包装，放在适当的位置。

3. 将出口与接收瓶相连。

4. 保证接受瓶位于合适的高度，使收集培养基的瓶子正好位于过滤器下方，瓶口可被钟罩盖住，并且当装满的时候可以很容易地将瓶子取出。如果需要，可先用一个无菌培养瓶进行调试，但最后不要用这个瓶子收集无菌液。

5. 将压力瓶的入口与泵相连，出口与过滤器相连。

6. 将培养基缓慢地倒入压力瓶中，关闭盖子。

7. 对于可重复使用的过滤器，要将泵打开一段时间，使滤器湿润，然后将泵关闭并拧紧过滤架（使用一次性滤器，不需要此步骤）。

8. 将泵打开调到 100kPa（15lb/in^2）。当接收容器快装满时，打开管子接到培养基储存瓶中，分装至

要求的体积。

9. 从过滤钟罩下取出每一个瓶子盖好。

10. 将铝箔重新包在盖子上。

11. 在瓶子上贴标签，标注日期，签名。

12. 根据过滤后收集瓶子的大小及数量，在过滤的开始阶段、中段、末段分别从瓶中取样品置于37℃孵育一周（参见10.6.2节）做污染检测。

13. 4℃保存备用。质量控制完成前不要使用。

14. 过滤之后及无菌检测之后都要做记录。

过滤最好在正压条件下进行，可防止CO_2的逸出，而负压过滤会导致CO_2逸出。在非无菌储液瓶和一次性连线式过滤器之间使用蠕动泵时（图 10.12），最好也在正压条件下进行，一次性连线式过滤器，如 Millipak（EMD Millipore），可代替重复使用的装置。由于买来的一次性过滤器是无菌的，同时也不需要接收器（只要关闭蠕动泵就很容易停止流动），因此只需要准备并消毒培养基瓶。

10.5.3 血清

在组织培养过程中，血清的制备是难度较大的工作之一，因为原材料的浓度和质量千差万别，还因为血清的颗粒物质、胶质和黏性使灭菌过滤过程遭遇困难。此外，血清也是组织培养中最贵的一种成分，如果从商家购买，则占总预算的 20%~30%。从一致性和质量控制的角度考虑，购买无菌的血清当然最好，但如果实验室需要自己准备血清，可按照补充材料中提供的一个程序（见方案 10.16-Su）操作，外加一个血清透析的程序（参见方案 10.17-Su）。血清的透析可以去除小分子物质，它们可能干扰营养学研究。活性炭处理可消除类固醇激素（Charcol Stripped Serum，炭脱血清），而许多供应商可以提供已经炭脱的血清（如 Life Technologies）。血清也可用γ射线消毒（Nims et al.，2011），尽管可能无法消除很小的病毒。

10.5.4 其他试剂的准备与灭菌

个别的配方和制备程序收集在附录 I 中。总体来说，如果试剂有热不稳定性，可用过滤灭菌的方法；如果受热稳定，则可用高压灭菌的方法（表 10.3）。低结合性的过滤器（如 Millex-GV）适于蛋白质和多肽的灭菌。

10.6 培养基的质控、检测和储存

10.6.1 质量控制

实验室制备的培养基在使用前需要检测。如果购买的是已制成 1×工作液的培养基，则除了你对培养基的一些特殊要求外，应该信赖供应商所执行的质量控制。同样的，如果使用的是 10×浓缩液，生长和无菌检测已经做过，而其中唯一的变量是用于稀释的水。假定水的电导率和总有机碳水平的下降在说明书规定的范围内（参见 10.4.1 节），并且水的供应也没有大的变化，大多数实验室

可以接受厂商的承诺以作为最终的质量控制，但还是希望检测一下完全培养基的无菌性。

然而，如果培养基是用干粉配制，则要在实验室进行灭菌，需要进行质量控制以确定真正无菌，同时尽管假定所有组分已溶解，还是要准备进行供应商关于培养基促生长活性的质量控制。由基本组分制备的培养基需要进行完整的质量控制，包括无菌检测和培养检测。

10.6.2 无菌检测

起泡点 当正压过滤完成，所有液体已通过滤器时，提高泵的压力直至滤器流出物中形成气泡，这就叫起泡点（bubble point），它会在压力是过滤压力的两倍多时出现（参见厂商说明书）。如果滤器在灭菌压力（100kPa）或更低压力时出现起泡，那么它已经穿孔，应该丢弃。在这种情况下，任何已经收集的滤出液都应该被认为是未灭菌的，需要重新过滤。专用的、一次性的滤器极少有不能通过起泡点测试的，这种测试是很容易且很快可以完成的。可重复使用的滤器会通不过这种测试，因此需要在每次过滤后进行检测。

下游二次过滤 在主灭菌过滤器的下游放置一个可拆卸的 0.45μm 的滤器。任何由于第一个滤器的失效而通过的污染，将会被第二个滤器除去。过滤结束后，取下第二个滤器的滤膜并放置在营养琼脂上。如有菌落出现，则应丢弃或重新过滤培养基。这种方法具有监测所有滤出液的优点，而不只是其中一部分，虽然它同样也不能避免在装瓶和封口过程中被污染的风险。

温育 在过滤的开始、中间和结束时取样，如果瓶子小，可以直接用瓶子；如果瓶子大，为了不浪费培养基，可以在过滤时将样品取出收集到较小的容器中。然而，请记住，如果每瓶装 1000mL，则取 1mL 样品会使敏感度降低 1000 倍；如果不准备牺牲这整瓶的培养基，则至少应取出 100mL 作为样品。最好不要从每一个瓶子中取样，因为这样做增加了这些瓶子污染的危险；取样时降低瓶中体积，从而改变了随后加入此瓶的附加物的稀释度。较好的做法是在过滤过程中，每隔一段时间收集少量的样品用于检测。

样品培养可以根据下面两种程序之一进行。

（1）37℃培养一周。任何一个样品变混浊，应丢弃样品并将这批培养基重新灭菌。如果其他储存的瓶子中也出现被污染的标志，则整批培养基都应丢弃。

（2）为了更全面的检测，同时，当要过滤的液体本身不具有营养物时，可像本节描述的那样，取样，每个按 1/3 稀释到营养肉汤中（例如，胰蛋白酶大豆培养基、硫代乙醇酸盐和 Sabourard's 培养基）。每个样品分成两份，一份在 35~37℃培养 10 天，另一份在 20~26℃培养 10 天（图 10.16），同时设立非接种的对照。如果样品培养后有疑问，将它们混合后等分，接种于营养琼脂上并在 35~37℃和 20~26℃温育。

高压蒸汽灭菌的溶液 假定在高压蒸汽锅的中心部位已进行了相应监测（灭菌温度和时间）（参见 10.4 节），那么对高压蒸汽灭菌的物品进行无菌检测就没有多大必要。

10.6.3 培养基和血清的培养检测

商家生产的培养基应经过维持一种或多种细胞系生长能力的检测（如果没有，你应该换供应商了！）。然而，在特定情况下，你可能想检测自己的培养基的质量：①如果是在实验室中由基本组分配制而成；②如果向培养基中加了添加物；③如果培养基有特殊用途，供应商不能进行检测；④如果培养基由干粉配制，且过滤过程有使组分丢失的危险。

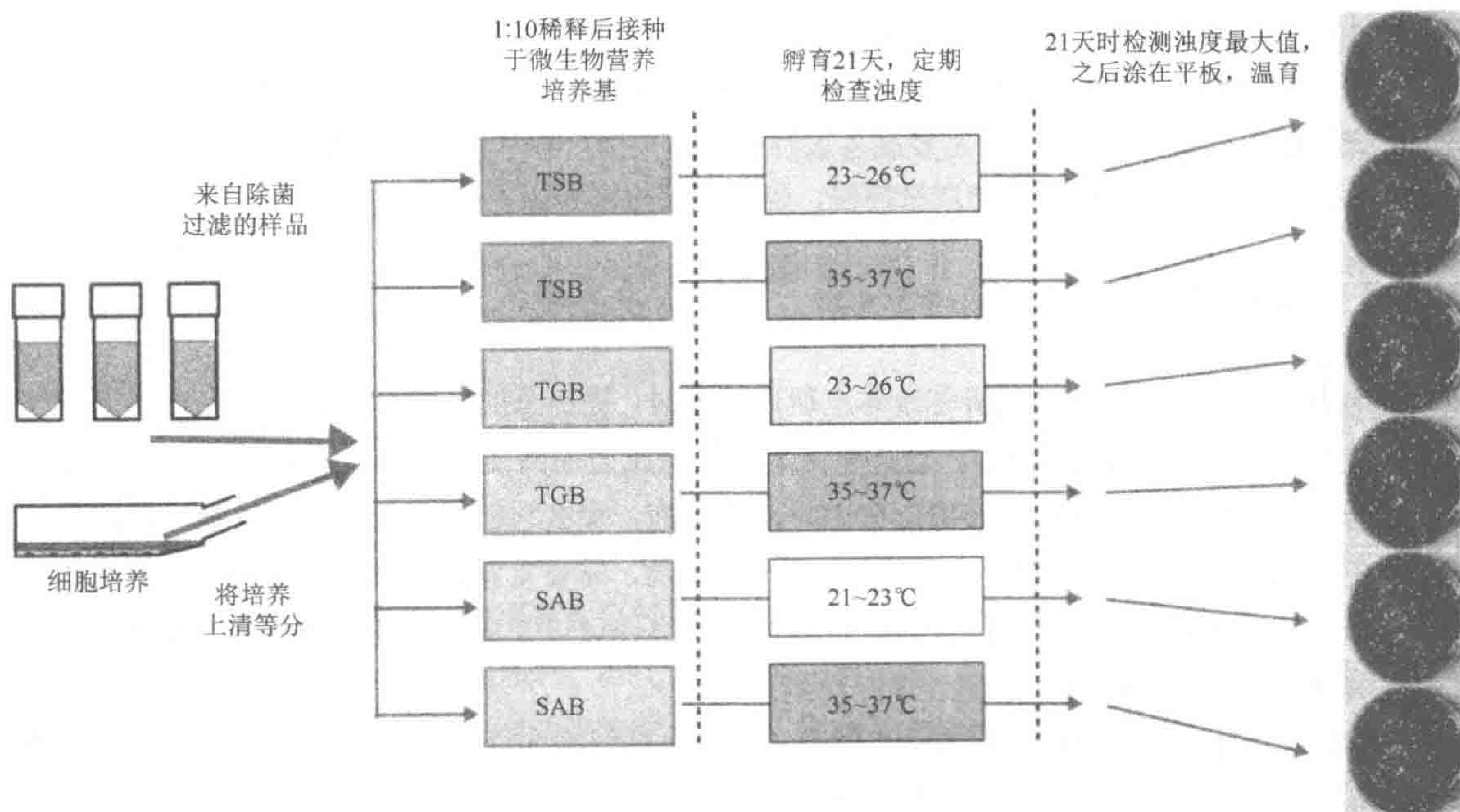


图 10.16 微生物培养。用微生物培养来测试灭菌过滤后样品的无菌性，或疑似污染的培养上清（TBS. 大豆胰酶水解物培养基，用于分离需氧和兼性需氧有机体；TGB. 硫代乙醇酸盐培养基，用于分离厌氧和微需氧有机体；SAB. Sabourard's 培养基用于分离真菌）。也可选择其他培养基，包括 Toldd-Hewitt 培养基（代替 TSB）、脑-心浸出液培养基（代替 TGB）及 YM 培养基（代替 SAB）[改编自 Stacey 和 Auerbach（2007）]

培养基在过滤的过程中有可能受有毒物质的污染。例如，一些滤器为了容易保持湿润而用微量去污剂处理过，当过滤培养基时，这些去污剂可能会进入培养基中。这种滤器应该在使用前先过滤一些 D-PBSA 或 BSS 达到清洗的目的，或者是弃掉前面的过滤液。聚碳酸酯滤器（如 Nuclepore）不用去污剂处理即可湿润，一些人喜欢用它，尤其是在过滤血清浓度低的培养基时。

培养物检测主要有 3 种形式：①贴瓶率；②在正常培养密度和达到饱和密度时的生长曲线；③特殊功能的表达（例如，诱导剂存在下的分化，病毒繁殖，特殊产物形成或特异抗原表达）。所有这些对新培养基的检测都应以常规培养基作为对照。

贴瓶率 贴瓶率检测（参见方案 23.10）是最敏感的培养检测，可检测到轻微的营养不足和低浓度的毒素，这些在细胞密度较高时是不明显的。这种检测最好应在有限的血清浓度下进行（如果需要使用血清），否则会掩盖培养基中的营养不足。接下来用 A549 细胞来进行测试，在 10%血清培养条件下，其贴瓶率大约为 50%，5%时贴瓶率大约为 10%，但最好要用方案 23.10 先测定一下将用于实验的细胞的贴壁率，并且是在限制血清浓度（如 5%）的条件下。

方案 10.14 用贴瓶率测试培养基

概要

接种低密度细胞，温育至集落形成（参见方案 16.1）；染色，统计集落数。

材料

无菌

- 贴壁细胞，如 A549，培养至对数期（参见图 10.2）
- 对照生长培养基：常规的 DMEM/F12 含 5% FBS　100mL
- 测试生长培养基：常规的 DMEM/F12 含 5% FBS　100mL
- 粗制胰蛋白酶，0.25%　10mL
- Petri 培养皿，6cm　20 个
- 试管或常规容器，用于稀释　20 个
- 红细胞计数器或电子细胞计数仪
- 固定用无水甲醇　100mL
- D-PBSA　200mL
- 染液：结晶紫　100mL
- 过滤漏斗和滤纸（用于回收染液）

操作步骤

1. 胰蛋白酶消化细胞（参见方案 12.3）产生单细胞悬液。
2. 细胞消化的过程中：
   （a）在培养皿的底部做上标记；
   （b）量出培养基用于稀释（图 10.17），每个稀释度需要 3 份，培养基要够用有余。
3. 细胞变圆开始脱落：
   （a）用含血清或某种胰蛋白酶抑制剂的培养基吹打单层细胞；
   （b）细胞计数；
   （c）将细胞稀释至
   （i）2×10^4 个/mL 用于接种两个 $25cm^2$ 培养瓶，常规培养；
   （ii）2×10^3 个/mL，是系列稀释的最高浓度；
   （iii）用（ii）液稀释 5 个梯度，达到 200 个/mL、100 个/mL、50 个/mL、20 个/mL、10 个/mL。

4. 接种至培养皿，每个皿 5mL 培养基，分别含（iii）所制备的 5 种细胞浓度。接种两个 6cm 培养皿，每个皿的细胞浓度为 2×10^3 个/mL，在克隆化培养失败时可作为对照（以证明至少在最高浓度时有细胞存在）。

5. 用 5% CO_2 充入培养瓶，放到培养箱中。
6. 将 Petri 培养皿放在透明的塑料盒中，再放置在湿润的 CO_2 温箱中，克隆化培养过程中最好少观察。
7. 培养至肉眼可见细胞集落（1~3 周）。
8. 用结晶紫对集落进行染色。
   （a）去除培养皿中的培养基。
   （b）用 D-PBSA 冲洗细胞，丢弃冲洗液。
   （c）加 5mL 新鲜的 D-PBSA，再加入 5mL 甲醇，轻轻混匀（避免集落脱落）。
   （d）用 5mL 新鲜的甲醇替换 50∶50（D-PBSA∶甲醇）的混合液，固定细胞 10min。

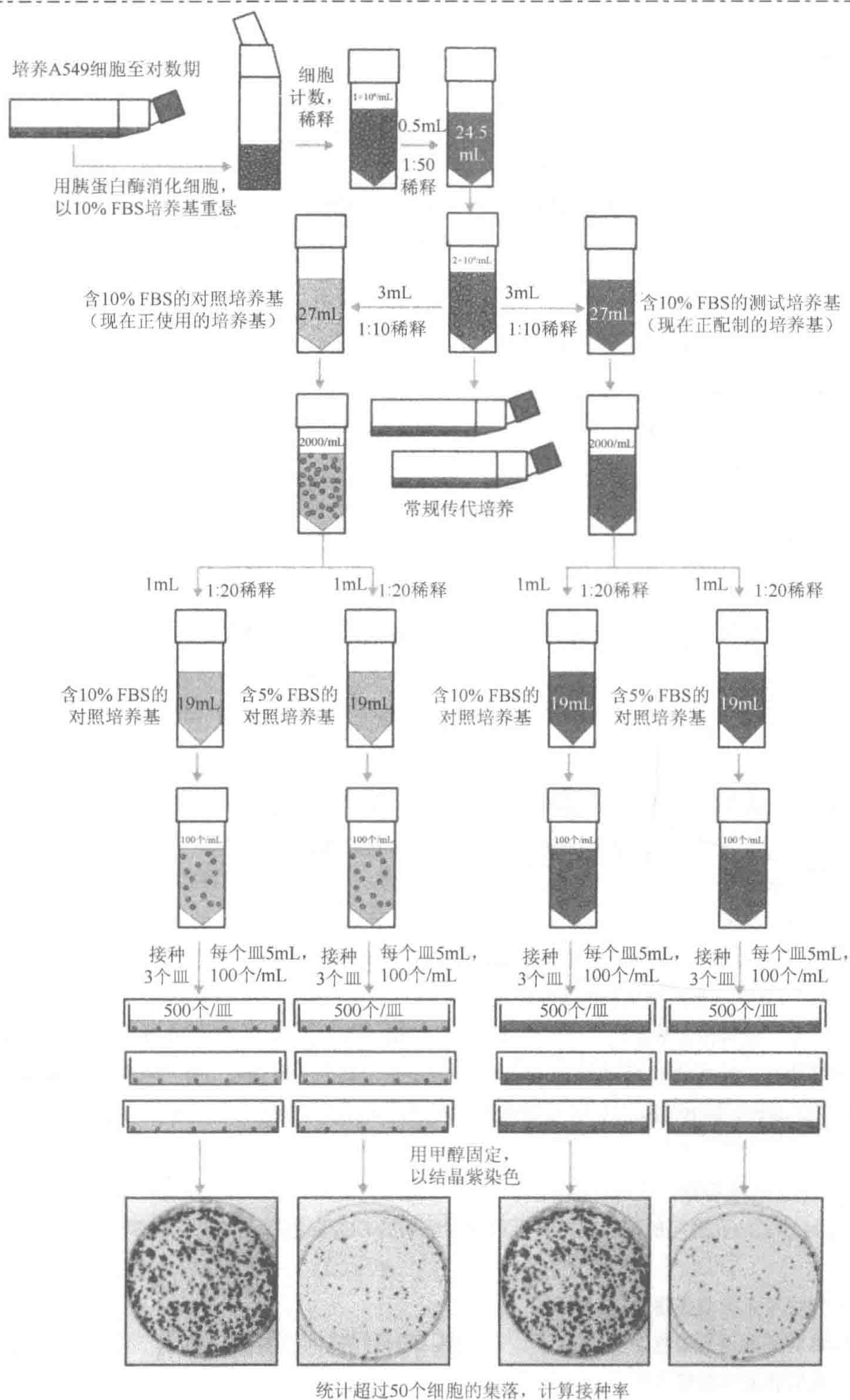


图 10.17 用接种率测试培养基。指数生长期的细胞用胰蛋白酶消化，计数后分别用 5%、10%血清的对照培养基和 5%、10%血清的测试培养基稀释，而后接种于平皿，100 个/mL，集落形成后染色

(e) 丢弃甲醇，每个6cm培养皿加入纯的结晶紫染液2~3mL，确认覆盖了整个生长表面。

(f) 染色10min。

(g) 移除染液，将染液过滤后回收至染液瓶中。

(h) 用水冲洗培养皿，干燥。

9. 统计每个皿中的集落数，不包括小于50个细胞的集落。使用放大查看器有助于统计集落数。

注意事项 必须设置一个临界值，高于此数值的可以统计在内。如果大多数集落的细胞数在一百至几千，就将临界值设置在每个集落50个细胞。在实践中，用肉眼观察时，很自然就会确定这个临界值。然而，如果集落很小（<100个细胞），临界值就要设置在每个集落16个细胞。低于16个细胞时（相当于细胞连续分裂4次），难以想象这些细胞能够继续增殖。

如果将血清浓度降至5%，只有很小或没有影响，就再降至2%，甚至1%，再重复做实验，并把此浓度作为正确的有限浓度用于进一步的测试。一个克隆生长测试，不是总能测出某种成分的量的不足，除非测量克隆的大小。举例来说，如果一种或多种氨基酸的浓度偏低，可能不会影响贴瓶率测试，但会影响克隆大小的平均值。由于这个原因要进行生长曲线的测试。

生长曲线 生长曲线（参见方案23.7~方案23.9）能给出3个测量参数：①传代培养后细胞开始增殖前的滞留期，显示细胞是否必须要适应不同的环境；②位于指数生长期中段的细胞倍增时间，显示培养基的生长促进能力；③可达到的最大细胞密度，显示是否存在某些营养成分的限制浓度。对于生长时对密度不敏感的细胞系（如连续细胞系，见22.4.2节），最终细胞密度可显示可能的总产量，通常反映了总氨基酸和葡萄糖的浓度。记住，只能提供一半最终细胞密度的培养基生产每个细胞的费用是原来的两倍。生长曲线的测定有以下方法：每隔一段时间统计细胞数量（参见方案23.7~方案23.9）；对生长中的细胞作图像分析（如Incucyte或Cell-IQ；见23.8.1节）；或进行色度检测（参见24.3.5节）。

方案10.15 用生长曲线测试培养基

概要

接种12块12孔板，用5%和10%血清的对照培养基和测试培养基培养细胞，每天收一块板，用胰蛋白酶消化细胞，收集后统计每个孔的细胞数。

材料

无菌或无菌操作

- 贴壁细胞培养，如A549，培养至对数期，一个75cm^{2}瓶。
- 粗制胰蛋白酶，0.25%，含有10mmol/L EDTA　　10mL
- 生长培养基，含26mmol/L $NaHCO_3$

- 含 5% FBS 的对照培养基　120mL
- 含 10% FBS 的对照培养基　200mL*
- 含 5% FBS 的测试培养基　120mL
- 含 10% FBS 的测试培养基　120mL
- D-PBSA（用于预洗和细胞计数）　500mL
- 12 孔板，12 个

非无菌

- 用于放置培养板的塑料盒或托盘
- CO_2 温箱或用 5% CO_2 充气的洁净盒子

操作步骤

1. 胰蛋白酶消化细胞，如常规传代（参见方案 12.3）。
2. 稀释细胞悬液至 2×10^4 个/mL，每种培养基配 30mL。
3. 接种 12 个 12 孔板，每孔 1mL 细胞悬液（图 10.18）：
   (a) 第一列的 3 个孔加 5% FBS 的对照培养基
   (b) 第二列的 3 个孔加 10% FBS 的对照培养基
   (c) 第三列的 3 个孔加 5% FBS 的测试培养基
   (d) 第四列的 3 个孔加 10% FBS 的测试培养基

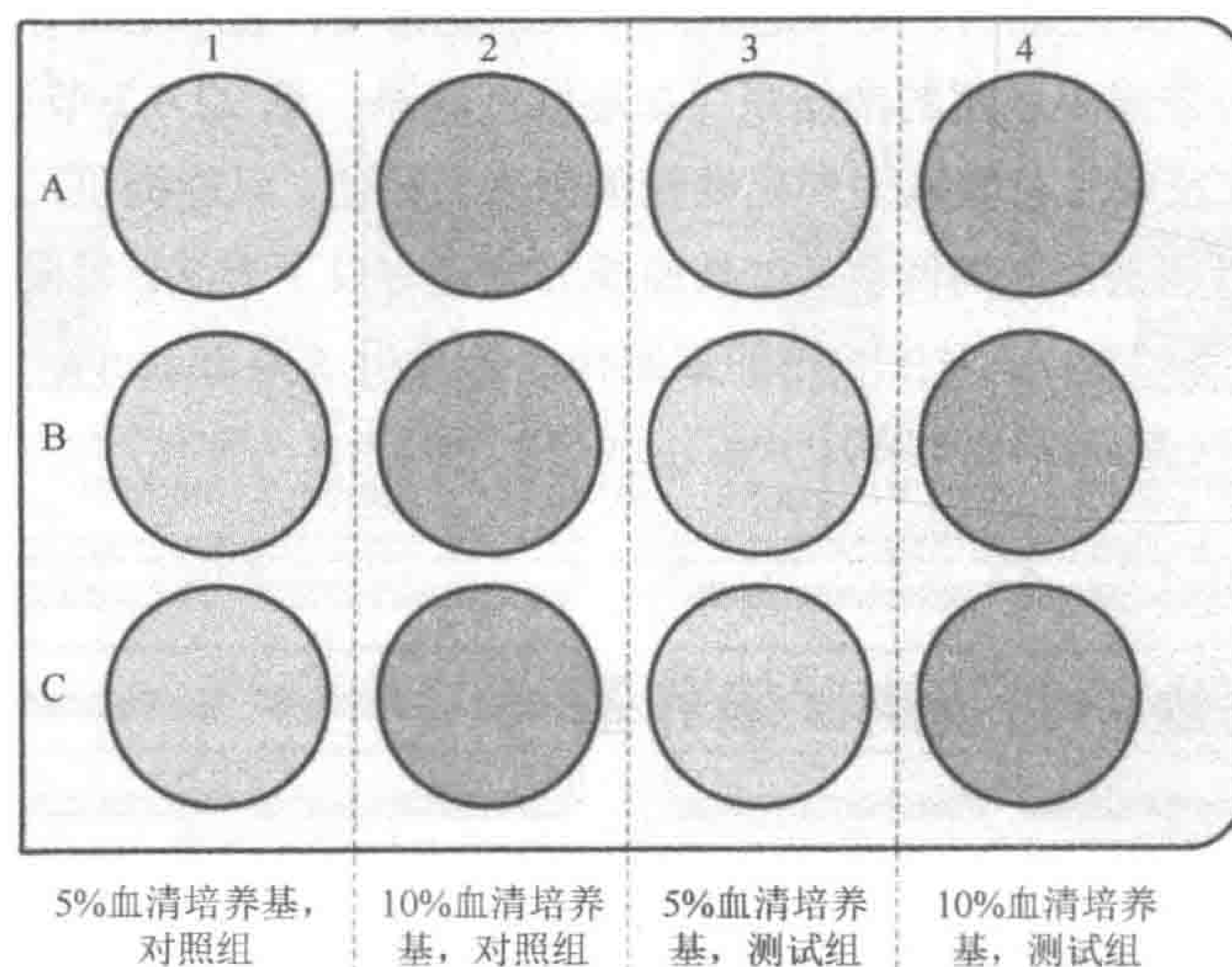


图 10.18　用多孔板做生长测试。用 12 孔板做重复培养，每日收集细胞计数。第一列是 5%血清培养基的对照组；第二列是 10%血清培养基的对照组；第三列是 5%血清培养基的测试组；最后一列是 10%血清培养基的测试组。每天收集一块板

4. 将培养板放在潮湿的 CO_2 温箱中，或放在 5% CO_2 充气的密封盒子中。
5. 24h 后，从温箱中拿出第一块板，统计每个浓度 3 个孔中的细胞数：

* 原书数据有误。

(a) 彻底吸去每个孔中的培养基。

(b) 每孔加入 0.5mL 胰蛋白酶/EDTA。

(c) 将培养板温育 15min。

(d) 每孔加 0.5mL 含 10%对照血清的培养基，用胰蛋白酶/EDTA/培养基将细胞吹打散开。

(e) 用电子计数器计算悬液中的细胞数，按照制造商的指令操作。

注意事项 红细胞计数板也可用于统计细胞，但可能难以用于低细胞密度的情况。如果使用红细胞计数板，要将胰蛋白酶的体积减少到 0.1mL，用一个没有胰蛋白酶泡沫的移液管，以胰蛋白酶溶液小心吹打细胞。将细胞加至红细胞计数器，统计规定方格中的细胞，细胞数至少要达到 200 个（见方案 23.1），将统计数乘以 10 就是每毫升的细胞数。

6. 每天重复步骤 5，连续 10 天。
7. 第 3 天和第 6 天更换培养基（参见方案 12.2，彩版 22b）。
8. 在第 5 天和第 10 天用 Giemsa（吉姆萨）染液各染一块板（参见方案 18.2）。
9. 计算每孔的细胞数目（或每毫升的细胞数，胰酶消化重悬后的细胞计数），将每毫升的细胞数（细胞浓度）对应培养天数作出半对数图（另见 23.9.3 节）。因为每孔是 3cm^2，将细胞数除以 3，就是每平方厘米的细胞数（细胞密度），也可用这个数值对应培养时间作图。
10. 从曲线上可得出滞留期、倍增时间、细胞终浓度（见 23.9.3 节）。


彩版 22

特殊功能 如果要检测特殊功能，应该用正在使用的实验系统（如培养几天后培养基中的病毒滴度或产量）做标准检测，新旧培养基应同时进行。

进行这些检测的一个主要要求是，它们最好应在现有培养基原料用尽以前进行，这样就可以得到正确的比较，而且如果培养基没有通过质量控制（QC）检测，也有时间去准备新鲜的培养基。

记录 所有的质量控制测试必须记录在一个记录本或计算机数据库中，包括与这批培养基制备有关的其他细节，还包括被检测溶液的批号和测试者的姓名（参见表 10.5）。监管配制和灭菌的人员应查看这些记录，确定不合格的比率和趋势，检查是否需要修改方案。

10.6.4 储存

对于不同培养基的保存期限看法不同。作为粗略指导，不含谷氨酸的培养基在 4℃可以保持 6~9 个月。一旦加入谷氨酸、血清或抗生素，则只能保存 2~3 周。因此，含有不稳定组分的培养基要么在制备的 3 周内使用，要么在–20℃保存（另见 27.2 节练习 6）。用谷胱甘肽，如 Glutanmax（Life Technologies）代替谷氨酰胺可以增加培养基的保存期，提高其在培养过程中的稳定性。储存的培养基也会出现沉淀，如果在加温的条件下不能再溶解，可能就是某种成分发生了化学变化（如与磷酸盐结合的金属），也许是不可逆的。

一些种类的荧光会导致核黄素、色氨酸和酪氨酸变质成为有毒副产物，主要是过氧化物（Wang and Nixon，1978；Tayloy，1984；Edwards et al.，1994）。而部分细胞毒性作用可能是由于光化学恶化作用，对细胞有直接的诱变作用（Bradley and Sharkey，1977）。含有 HEPES 的培

养基如果暴露在荧光下也有可能变成毒性物质（Lepe-Zuniga et al.，1987）。因此，应该在保存培养基的冷室和培养细胞的温室使用白炽灯，且当这些屋子不用时要关掉灯。装有培养基的瓶子不应暴露在荧光灯下超过几小时，长期保存建议使用无光冰箱。节能灯可能与荧光灯有相似的效果。

参 考 文 献

Bradley MO, Sharkey NA (1977). Mutagenicity and toxicity of visible fluorescent light to cultured mammalian cells. *Nature* 266:724–726.

Breach MR (1968). *Sterilization: Methods and control.* London:Butterworths, p. 9.

Charcoal stripped serum (www.protocol-online.org/biology-forums/posts/1890.html).

Earle W, Highhouse F (1954). Culture flasks for use with plane surface substrate tissue cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* 14:841–851.

Edwards AM, Silva E, Jofre B, Becker MI, De Ioannes AE(1994). Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *J. Photochem. Photobiol. B* 24:179–186.

ISO 3696-1987: www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=9169.

Lepe-Zuniga JL, Zigler JS Jr, Gery I (1987). Toxicity of light-exposed Hepes media. *J. Immunol. Methods* 103:145.

Nims RW:, Gauvin G, Plavsic M (2011). Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes–a review. *Biologicals* 39:370–377.

Paul J (1975). *Cell and tissue culture.* Edinburgh Churchill Livingstone, p. 9.

Prince A, Mogg RC. (1960). "Portex" nylon film for sterilising and storing surgical equipment. *J. Med. Lab. Technol.* 17:180–182.

Stacey GN, Auerbach JM (2007). Quality control procedures for stem cell lines. In FreshneyRI, StaceyGN, AuerbachJM (eds.), *Culture of human stem cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Taylor WG (1984). Toxicity and hazards to successful culture: Cellular responses to damage induced by light, oxygen, and heavy metals. *In Vitro* 20:58–70.

Wang RJ, Nixon BR (1978). Identification of hydrogen peroxide as a photoproduct toxic to human cells in tissue-culture medium irradiated with "daylight" fluorescent light. *In Vitro* 14:715–722.

Water in the laboratory (www.millipore.com/lab_water/clw4/tutorial&tabno=4).

WHO (1989). *Guidelines on the sterilization and disinfection methods effective against human immunodeficiency virus (HIV)*, 2nd ed., WHO AIDS Series 2. Geneva: WHO (http://whqlibdoc.who.int/aids/WHO_AIDS_2.pdf).

Wikipedia. Purified water (http://en.wikipedia.org/wiki/Purified_water#Laboratory_use).

（陈实平　译）

第11章

原代培养

原代培养是指细胞分离之后至第一次传代之前的细胞培养阶段，之后就转变成细胞系（参见2.7 节和附录Ⅳ）。尽管“原代培养”和“细胞系”的定义已经正式被采纳（Schaeffer，1990），但随着特殊细胞早期培养物的商业化供应的出现（参见补充材料中的附录Ⅲ），似乎增加了“原代细胞”或“原代细胞系”这类短语的使用。获得这些细胞时，必须明确它们的含义，有时它可能是原代培养物的解离细胞，购买者接种培养它们，可能成为一种细胞系；而另一些情况是，它可能已经从原代培养物传代，是正在生长的培养物，是一种细胞系（通常是有限细胞系），或者它是由原代培养物解冻而来的细胞，或者是接近于第一代和第二代的培养物。这种表述的差别或许有些咬文嚼字，但它对于了解培养物所处的阶段是非常重要的，这关系到它的均一性（参见2.7 节），以及在衰老之前还能传几代，即培养物的寿命。如果是从原代培养物开始传代，应称为早期传代细胞系（early passage cell line），而不是“原代细胞系”（primary cell line），这是一个自相矛盾的术语。“原代细胞”应是指来自原代培养及准备再接种的细胞。

11.1 原代培养入门

原代培养可分为 4 个步骤：①获取样品；②分离组织；③解剖或解离组织；④接种于培养器皿中培养。分离组织之后，原代细胞培养可分为两种：一种将组织块贴附于适宜的基质中，细胞可从组织块向外迁移生长；另一种是将组织块用机械法或酶消化法处理获得细胞悬液，接种细胞悬液，其中部分细胞最终将黏附于基质开始生长。对于大多数正常而非转化的细胞，除造血细胞外，为了更有效地生存与增殖，需要黏附于某一平面。而转化细胞，尤其是可转移的动物肿瘤细胞，能够在悬浮状态下增殖（参见 22.4.1 节）。

11.1.1 用于解离组织的蛋白酶

组织中细胞与细胞之间的黏附是借助多种相互作用的同类糖蛋白分子［细胞黏附分子（CAM）］（参见 2.2.1 节）。其中部分黏附分子具有 Ca^{2+}依赖性（钙黏着蛋白），故对螯合剂敏感，如乙二胺四乙酸（EDTA）或乙二醇二乙醚二胺四乙酸（EGTA）。整联蛋白（integrin）含有 Ca^{2+}结合结构域，可结合于细胞外基质中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（RGD）模体，可因缺少 Ca^{2+}而

受到影响。细胞间基质和基膜还含有其他糖蛋白，如纤连蛋白和层粘连蛋白，它们对蛋白酶敏感；还有蛋白聚糖，量很少但有时可被多糖酶如透明质酸酶或肝素酶等降解。选择消化液最容易的方法是从单一的消化液入手，过渡至复合的消化液（表 11.1），开始用胰蛋白酶或胰蛋白酶/EDTA的混合物，后加入其他蛋白酶促进消化，有时为提高细胞活性而去除胰蛋白酶。使用含有蛋白酶的鸡尾酒式酶混合液存在一种风险，它可导致蛋白质水解作用而使某些酶失活，例如，DNA 酶如果加至胰蛋白酶中会失效，必须在胰蛋白酶灭活之后再加入。

最常用于组织消化的酶包括胰蛋白酶粗制品、胶原酶、弹性蛋白酶、链霉蛋白酶、裂解酶、DNA 酶、透明质酸酶。这些酶既可单独使用，又可联合使用。例如，弹性蛋白酶与 DNA 酶用于Ⅱ型肺泡细胞的分离（Dobbs and Gonzalez，2002），胶原酶与裂解酶联用（Booth and O'Shea，2002），胶原酶与透明质酸酶联用（Berry and Friend，1969；Seglen，1975）。还有其他非哺乳动物酶类也可用于最初的解离，如 Trypzean（Sigma），一种重组的、来自玉米的胰蛋白酶；TrypLE（Life Technologies），重组的、微生物来源的胰蛋白酶，以及 Accutase 和 Accumax（Accutase）、Liberase Blendzyme 3 或 Liberase™（Roche）等。因为粗制品常混杂有其他蛋白酶，所以粗制品通常比精制品更有效，虽然精制品更具有特异性，并且毒性小。胰蛋白酶和链霉蛋白酶的解离效果最完全，但会造成细胞损伤；相反，胶原酶和裂解酶解离效果不完全，但对细胞损伤较小。

因为酶的特殊活性可能有变化，所以要保证每一批具有相同的活性，或调节浓度使它们达到相同的活性（参见附录Ⅰ中的胰蛋白酶）。应用胰蛋白酶时，其级别的选择是很难的，有两种相反的倾向：①胰蛋白酶越纯，毒性越小，其作用越可预见；②胰蛋白酶越粗，由于含有其他蛋白酶，可能越有效。事实上，由于对毒性的敏感性和消化能力难以预测，因此采用何种适宜的胰蛋白酶产生活性细胞有必要进行预测实验。到目前为止，粗制胰蛋白酶是最常用于解离组织的酶（Waymouth，1974），许多细胞对它有相当好的耐受性，它又对许多组织有效。传统上认为粗胰蛋白酶就是 1∶250 级别，具有 250 USP U/mg 的活性，相当于 750 BAEE U/mg。Sigma 的 T4799 接近于 1000~2000 BAEE U/mg。纯的胰蛋白酶产品各不相同，Sigma 的 Type IX-S（T0303）是 13 000~20 000 BAEE U/mg，Worthington 的色谱纯产品（代码 TRL3，经过 0.22μm 滤膜过滤除菌）大约是 10 000 BAEEU/mg，所以这两者的活性都比最初的 1∶250 级别高出 10 倍。重组的胰蛋白酶产品，如 TrypLE（Life Technologies）和 Trypzean（Sigma-Aldrich），具有类似于粗制胰蛋白酶的活性，适用于细胞培养。尽管特异性活性不总是标注（Prospec 的重组人胰蛋白酶标注的特异性活性是 10 000 BAEE U/mg，Roche 的重组猪胰蛋白酶标注的是 10 800 U/mL），但仍然可以认为它们是比较纯的、不含有动物来源的产品。

胰蛋白酶作用的最佳 pH 是 7.8~8.5，但为了避免过碱，通常在 pH 7.6 使用。如果在组织含量高的情况下使用，如冷胰酶消化（参见 11.3.4 节），有些组织（如脑组织）可能使溶液 pH 下降，在孵育和解离之前也许需要更换新鲜胰酶溶液。

其他酶和化学试剂 透明质酸酶可以与胶原酶合用以消化细胞间基质。DNA 酶可用来分解由破碎细胞释放的 DNA，DNA 会减弱蛋白质水解作用，并促进再聚合（表 11.1）。联合使用酶时，应当注意有些酶会使其他酶失活，例如，DNA 酶必须在胰蛋白酶去除之后再加入，因为胰蛋白酶可能会降解 DNA 酶。

胰酶产生的解离作用常合并使用 EDTA（1mmol/L）或 EGTA（6.5mmol/L），它们可以螯合参与细胞黏附的阳离子，尤其是 Ca^{2+}［如同 TEGPED（Stampfer et al.，2002）；见 11.3.2 节］。EGTA 可以使用较高的浓度，因为它比 EDTA 毒性低。如果有黏蛋白，可以用 0.05%二硫苏糖醇或乙酰半胱氨

酸来解离，可将它们溶于 D-PBSA 后过滤除菌，解离后通过离心去除（Lily Huschtscha，私人通信）。

表 11.1　用于解离组织的酶

酶	来源	浓度	基液	应用范围
粗制胰蛋白酶	猪胰腺	0.25%	D-PBSA 或 CMF±1mmol/L EDTA	许多组织，但上皮细胞产量低
胰蛋白酶+胶原酶	猪/细菌	0.25%粗制胰蛋白酶；200U/mL 粗制胶原酶	D-PBSA 或 CMF±1mmol/L EDTA	纤维组织
粗制胶原酶	细菌	200U/mL	完全培养基	许多组织，但特别适合于从结缔组织分离上皮细胞
纯的胰蛋白酶	猪胰腺	25μg/mL	D-PBSA 或 CMF±1mmol/L EDTA	许多组织，如肺组织（Finkelstein and Shapiro，1982）
TrypLE	重组，细菌（Life Technologies）	参照说明书	D-PBSA 或 CMF	干细胞
Trypzean	重组，玉米（Sigma）	参照说明书	D-PBSA 或 CMF	
rTrypsin	重组，细菌（Novozymes）	参照说明书	D-PBSA 或 CMF±1mmol/L EDTA	大批量操作
木瓜蛋白酶	木瓜	20U/mL	EBSS，含有 1mmol/L 半胱氨酸，0.5mol/mL EDTA	肾、神经细胞（Crozdanov et al.，2010）（Worthington），其他组织（Biological Industries）
胰酶	猪胰腺	1mg/mL	培养基	乳腺上皮细胞（Stampfer et al.，2002）
裂解酶		0.1~1.0mg/mL	培养基	去除成片上皮细胞（不是游离的上皮细胞）
链酶蛋白酶	细菌	0.1~1.0mg/mL	培养基	提供良好的单细胞悬液，但可能对一些细胞有损害
Liberase	细菌（Roche）	0.0025%	D-PBSA，CMF 或培养基	肝和胰腺细胞（见方案 25.6-Su）
Liberase/Blendzyme	细菌胶原酶与裂解酶	0.08~0.28 Wünsch U/mL	D-PBSA 或 CMF	从胰腺分离胰岛细胞
Accutase，Accumax	Molluscan（Accutase，Life Technologies）	参照说明书	D-PBSA，CMF 或培养基	神经干细胞
裂解酶	细菌（Roche）	0.6~2.4U/mL	D-PBSA	
DNA 酶		2~10μg/mL	培养基	使用其他解离试剂造成细胞损伤和 DNA 释放
透明质酸酶	牛睾丸（Sigma-Aldrich）	100U/mL	培养基+抗生素	乳腺上皮细胞（Stampfer et al.，2002）

11.1.2　解离过程的共同特点

虽然各种组织培养要满足不同的条件，但许多因素是大多数原代培养共同需要的。

（1）在取材时需去除脂肪和坏死的组织。

（2）需用锋利的手术刀将组织切碎，以减小对组织的损伤。

（3）适度离心以去除用于解离的酶。

（4）由于原代培养组织细胞的存活率很低，故用于原代培养的细胞的浓度应高于正常的传代培养的细胞浓度。

（5）营养丰富的培养基（如 Ham's F12）比简单的培养基（如 Eagle's MEM）更可取。如果可以添加血清，胎牛血清比牛或马的血清更好，细胞成活率更高。特殊细胞类型的分离可能需要选择性的无血清培养基（参见 9.2 节和第 25 章）。

（6）与成体组织相比，原代培养时用胚胎组织更易解离，细胞更易存活，增殖速度更快。

11.2 组 织 分 离

对人或动物的组织处理之前，请确保你的工作符合医学伦理学规则和现行的动物实验法规（Geraghty et al.，2014）（参见 6.9.1 节）。例如，英国 1986 年的动物实验（科学的操作程序）条例规定，使用胚胎或胎儿不得超过妊娠期的一半，现在的欧盟法规（EU Directives，2010）和美国实验室动物福利署也有规定（OLAW，2013）。对人体活检或胚胎组织进行研究时必须获得当地研究伦理委员会、患者及其亲属的同意（参见 6.9.2 节），并且受到国家的监管（US:OHRP 2011；UK:HFEA 2013，NRES 2013，HTA 2013）。

▲安全提示 处理人体组织需在Ⅱ级生物安全箱内按二级安全保护操作（参见 6.8.3 节）。

若取材部位容易被污染（如皮肤），应先用 70%乙醇消毒，在无菌条件下切除组织，放在取材用的 BSS（DBSS）或转运培养基中（参见附录Ⅰ），尽快转移至培养室。不要在培养室杀动物，因为动物可能引入微生物污染。若只能延迟转移，可于 4℃保存，不超过 72h，但是转移越快，存活率越高。

超过妊娠期一半的胚胎或胎儿动物，在取材之前可能需要用特殊的、仁慈的方法杀死；在英国，可查阅来自内务部的指南，包括在欧盟的法规中（EU Directives，2010）；在美国，可查阅实验室动物福利署（OLAW，2013）的指南。无指南可查的地方，可查阅当地动物伦理委员会的建议。通常从胎膜或胎盘分离胚胎，采用断头术是合乎伦理的，尤其是在预先将怀孕的子宫或卵置于冰上的情况下。

11.2.1 小鼠胚胎

小鼠胚胎是未分化间充质细胞培养物的便利来源，这些培养物常被称为“小鼠成纤维细胞”，常用作滋养层细胞（参见 16.2.3 节、25.1 节、25.13.2 节）。整个妊娠期是 19~21 天，依据小鼠品种决定。分离完整胚胎进行细胞培养的合适时间大约是第 13 天，这时的胚胎已相当大（图 11.1 和图 11.2），但仍含有高比例的未分化间充质细胞，它们是培养物的主要来源。但是要分离和处理超过

一半妊娠期的胚胎，可能需要许可证，所以用9天或10天的胚胎可能更合适。一旦选择了一个给定的胚龄并证明是令人满意的，就要在将来所有的研究中使用，不同的胚胎年龄，其细胞在培养时的形态、产生的基质、所提供的条件培养基很可能是不同的。虽然从较年幼胚胎获得的组织细胞的量相对少，但能够生长的细胞的比例更高。除了脑和心脏，多数器官大约是在妊娠的第9天开始形成，第11天之前都很难分离。单个器官的分离在13~14天时比较容易，多数器官要到第18天才完全形成。小鼠胚胎发育的各个阶段在爱丁堡小鼠图谱纲要［Edinburgh Mouse Atlas Project（EMAP，2013）］中有描述。

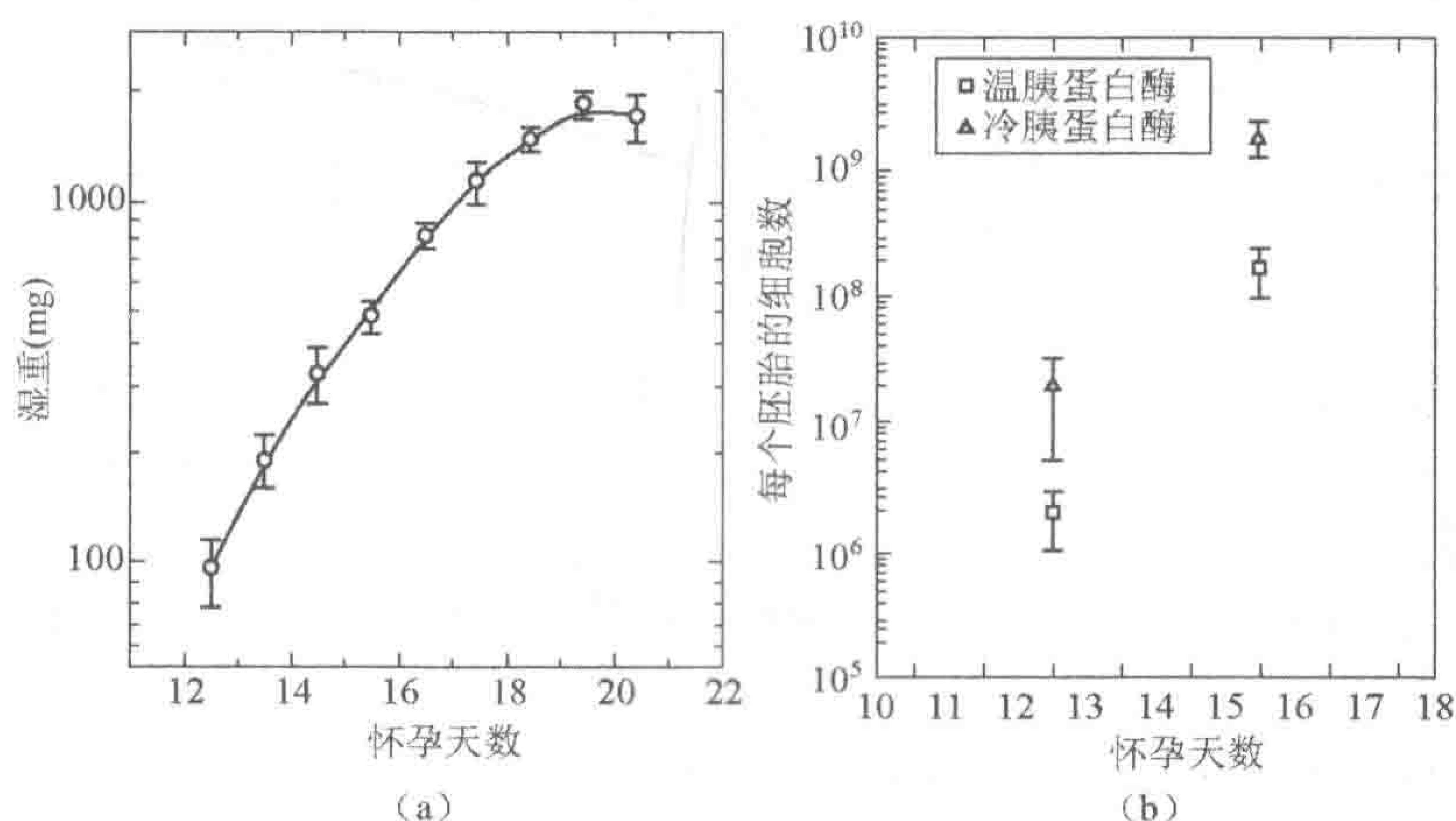


图 11.1 每只小鼠胚胎的总湿重与细胞产量。（a）无胎盘和胎膜的胚胎总湿重，平均值±标准差（Paul et al.，1969）；（b）每个胚胎的细胞产量，在0.25%胰蛋白酶中于37℃孵育4h后收集，中间不收集（方形），或浸于0.25%胰蛋白酶中于4℃孵育5h后再于37℃孵育30min后收集（三角形；方案11.6）

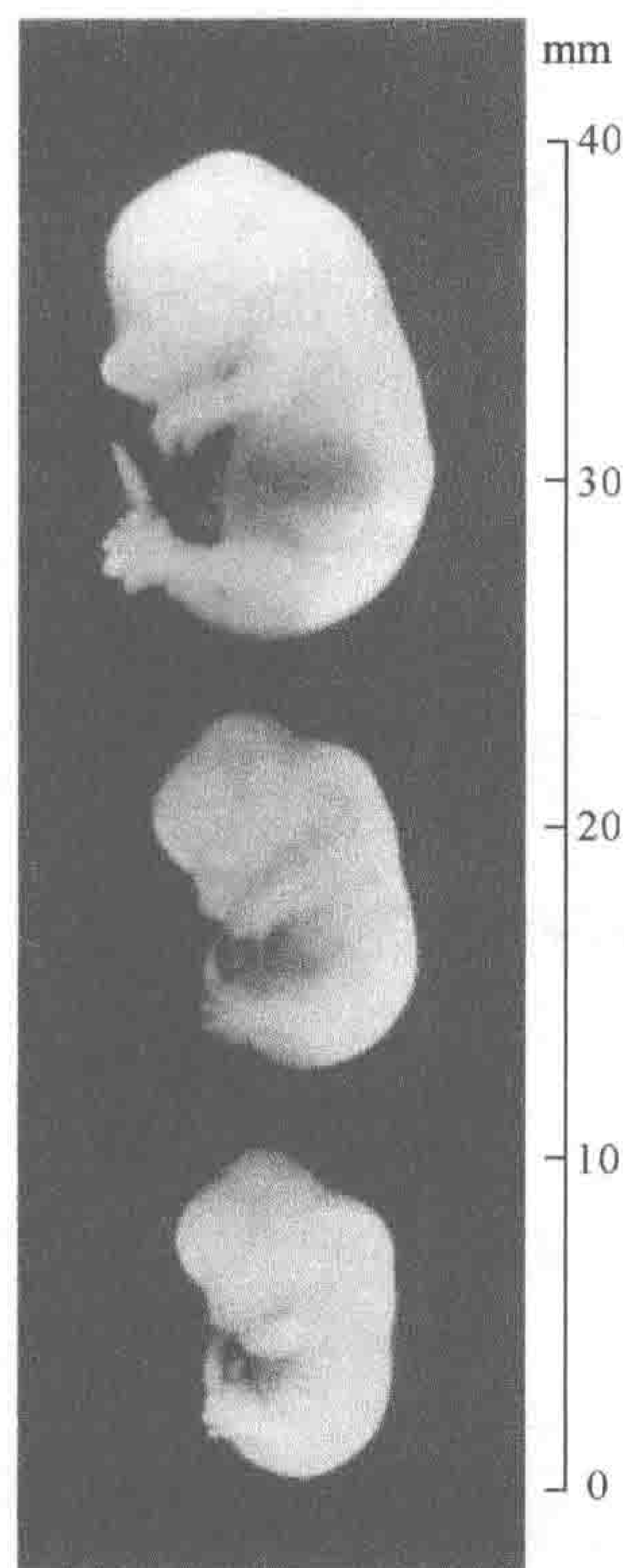


图 11.2 小鼠胚胎。孕后12天、13天、14天的胚胎，12天的胚胎（下部）取自一个小窝（3只），它们比正常情况下在此阶段的个体要大些

方案 11.1 分离小鼠胚胎

概要

从已知怀孕时间的孕鼠无菌切除子宫，分离胚胎。

材料

无菌

- DBSS：取材用BSS（含有高浓度抗生素的BSS，见附录Ⅰ），装在30~50mL的螺口试管或常用容器内
- BSS，50mL盛于无菌烧杯中（用于冷却烧过的器械）
- 培养皿，9cm
- 尖镊子
- 尖剪刀

非无菌

- 小的层流洁净台
- 计算怀孕时间的孕鼠（参见本方案的步骤1）
- 70%乙醇，储于洗瓶中
- 70%乙醇，用于消毒器械（参见图6.4）
- 本生灯

▲**安全提示** 将器械浸入乙醇后点燃，即对器械进行消毒时，不要将还很热的器械放回乙醇内！

操作步骤

1. 交配：将分笼的雄鼠和雌鼠合笼进行交配，雌鼠3天后可进入动情期，此时交配的成功率最高。这一过程可以有计划地进行，使胚胎在适宜的时间产生。为确定成功交配的时间，需每天早晨检查雌鼠的阴栓（位于阴道口的一个硬的黏液样栓塞）。

2. 计算胚胎发育时间：将发现阴栓的日子定为0天，胚胎发育时间由这一天开始计算。第13天的胚胎适合于做原代培养。

3. 拉颈处死小鼠［U K Schedule I procedure（Directive/63/EU，AnnexIV）］，用70%乙醇仔细消毒其腹部表面（图11.3a）。

4. 于膈膜附近的腹中线位置横向撕开皮肤（图11.3b），向两侧翻开皮肤，显露未接触的腹壁（图11.3c）。

5. 用无菌剪刀沿腹中线纵行剖开，显露腹腔脏器（图11.3d），此时可见充满胚胎的双角子宫位于后腹腔（图11.3e）。

6. 取出子宫置于盛有10~20mL DBSS的30mL或50mL带螺口盖的试管或常规容器内（图11.3f）。

注意事项 以上所有步骤应在组织培养室外进行，于小型超净台内快速操作将有助于保持无菌。不要把活体动物带入培养室，因为活体动物可带入污染。若动物尸体需在培养室内处理，必须先浸入乙醇或用乙醇涂抹，用后尽快处理掉。

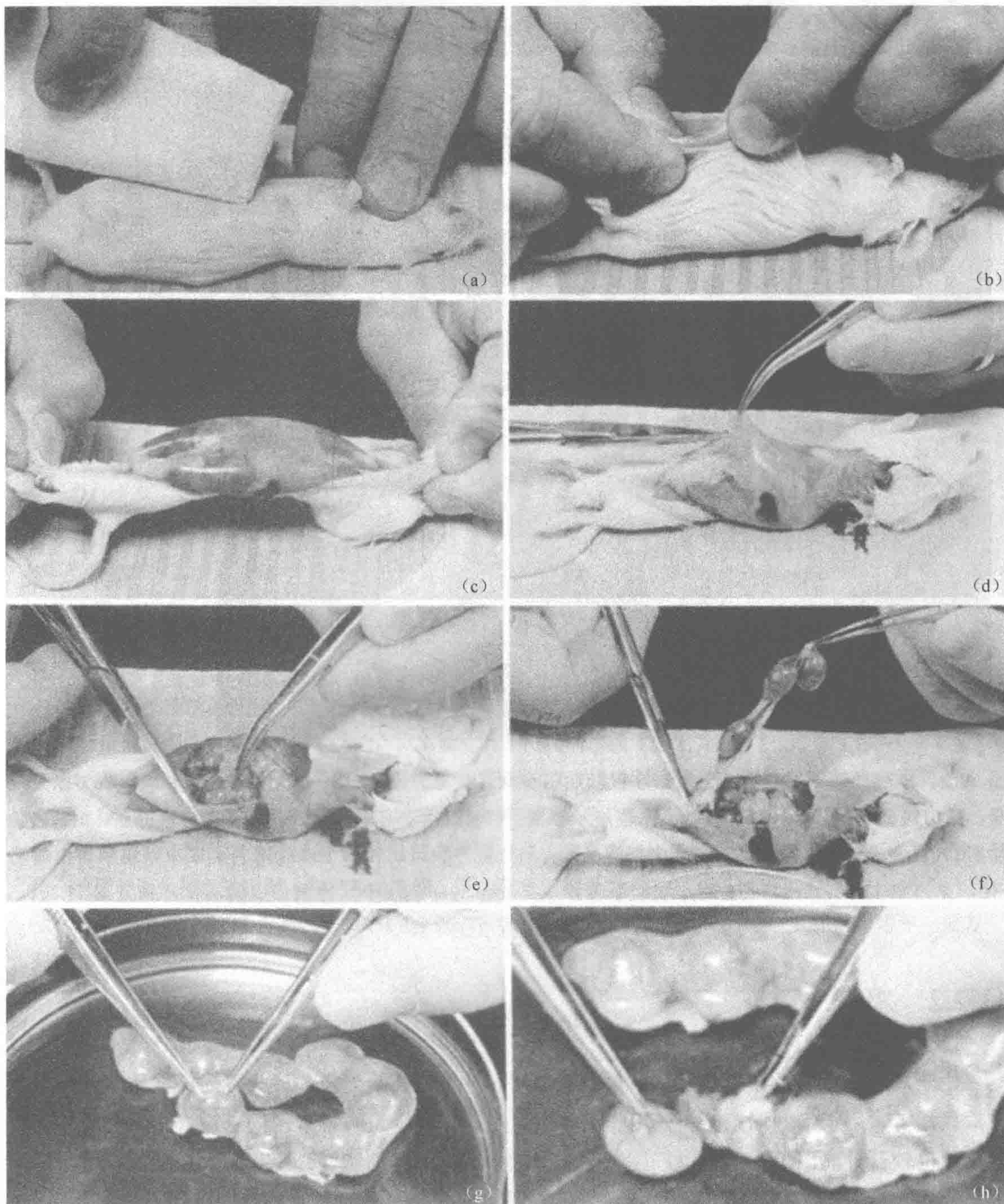
7. 将未处理的子宫移入培养室，转入新的培养皿中，内含无菌的DBSS（图11.3g）。

8. 分离胚胎：

（a）用两个无菌镊子撕开子宫，注意保持镊子尖闭合，以免过度破坏子宫及对胚胎施加过大压力（图 11.3g、h）；

（b）将胚胎与胎膜（图 11.3i）和胎盘剥离，放在培养皿的另一边，避开血污。

9．将胚胎转入新的培养皿中，若有大量的胚胎要取（如 4 或 5 窝以上），可将培养皿置于冰上（等待进一步解剖和培养，见方案 11.4~方案 11.10）。



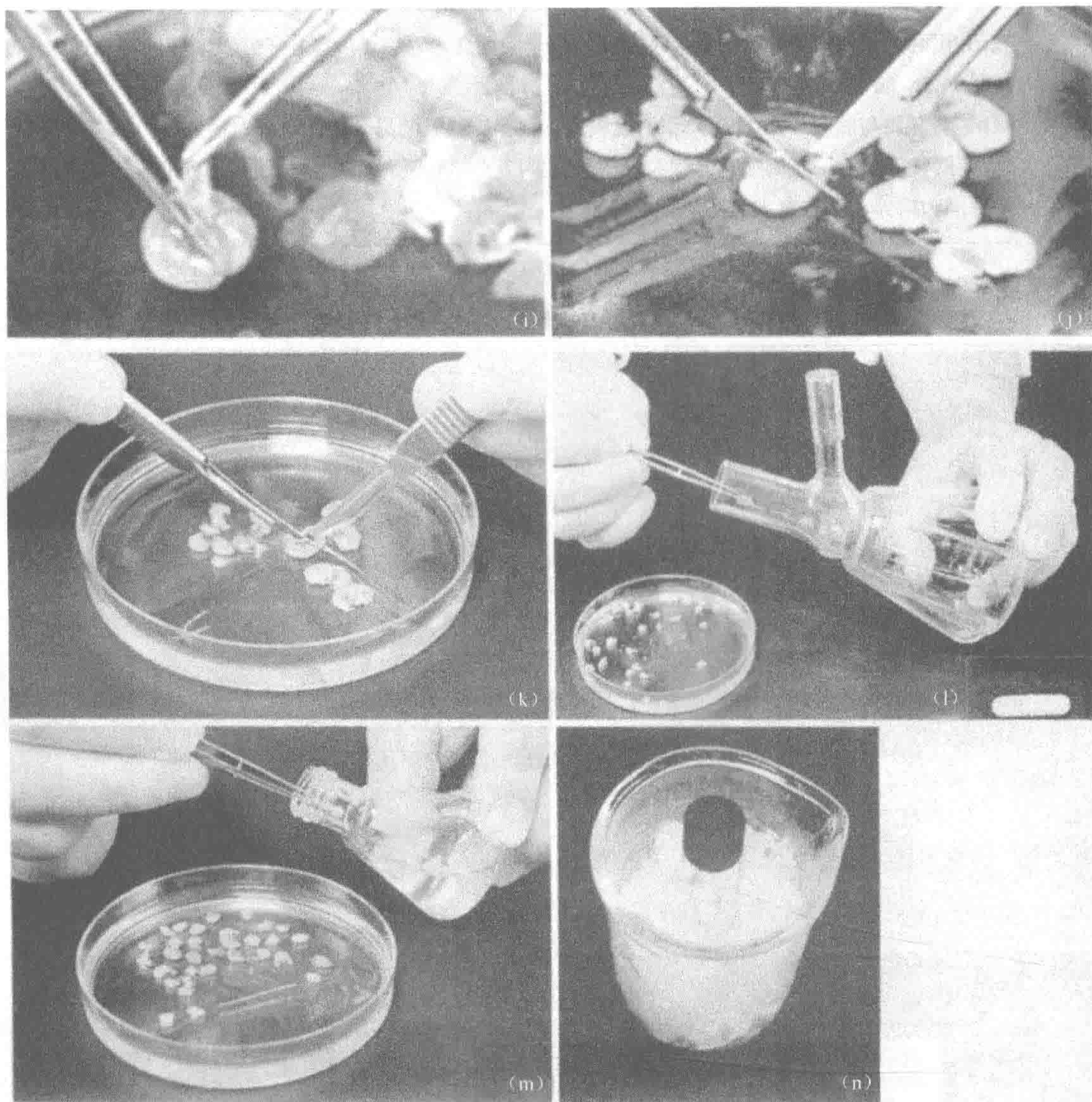


图 11.3 小鼠的解剖。解剖孕鼠取出小鼠胚胎的步骤（参见方案 11.1）：（a）擦洗腹部；（b）（c）撕开皮肤，露出腹壁；（d）打开腹腔；（e）原位展示子宫；（f）取出子宫；（g）（h）自子宫分离胚胎；（i）去除胎膜；（j）去除头部（随意的）；（k）切碎胚胎；（l）将小块组织转移至消化用的烧瓶中（温胰蛋白酶消化，见方案 11.6）；（m）或者将小块组织转移至 Erlenmeyer 烧瓶中（冷胰蛋白酶消化，见方案 11.7）；（n）将烧瓶放在冰里

11.2.2 鸡胚

由于鸡胚比同期的小鼠胚胎大，故较易分离。与小鼠胚胎一样，鸡胚可提供优质的间充质细胞原代培养，用于细胞增殖分析，用作滋养层细胞，并可作为病毒繁殖的基质。由于鸡胚体积较大，故也较易分离出单一器官以产生特殊类型的细胞，如肝细胞、心肌和肺上皮细胞。使用鸡胚也与使用小鼠胚胎一样，要符合动物法规，使用超过孕期一半的胚胎要有许可证。

方案 11.2 分离鸡胚

概要

无菌操作从蛋中取出鸡胚放入培养皿中。

材料

无菌

- DBSS：专用于取材的 BSS（含有高浓度抗生素的 BSS，见附录Ⅰ），装在 25~50mL 带螺口盖的试管或普通容器内
- BSS，50mL 盛于无菌烧杯中（用于冷却烧过的器械）
- 20~50mL 小烧杯或蛋杯
- 直头和弯头镊子
- 9cm Petri 培养皿

非无菌

- 孵化 10 天的有胚胎的鸡卵
- 70%乙醇
- 棉签
- 保持湿度的孵箱（非 CO_2）

操作步骤

1. 在湿润的环境中于 38.5℃条件下孵卵，每天转动 180°，虽然鸡卵孵育也需要 20~21 天，但它们的发育阶段不同于鼠胚。分离整个胚胎进行细胞培养，需在大约第 8 天时进行；若分离器官，则在第 10~13 天。
2. 用 70%酒精棉签消毒鸡卵，钝端向上放于小烧杯内（图 11.4a）。
3. 用无菌镊打破卵壳（图 11.4b），剥离卵壳直到气囊的边缘（图 11.4c）。
4. 重新消毒镊子后（浸入乙醇，烧干乙醇，于无菌的 BSS 中冷却；小心不要将正烧着的镊子放回乙醇中!），用镊子剥离下白色的壳膜，显露下面的绒毛尿囊膜（CAM）及血管（图 11.4d、e）。
5. 用弯镊子刺破绒毛尿囊膜（图 11.4f），轻轻夹住头部下方，提出胚胎（图 11.4g、h），不要完全闭合镊子，避免颈部被切断，将中指垫在镊子下，用它限制食指的压力（图 11.4g）。
6. 将鸡胚放入直径 9cm、含 20mL DBSS 的培养皿中（图 11.4i）（等待进一步解剖和培养，见方案 11.8）。

11.2.3 人体活检材料

处理人体活检组织需要解决在处理动物组织时所未遇到的问题。必须获得以下同意：①医院伦理委员会；②参与的内科或外科医生；③捐赠者或患者或其亲属（参见 6.9.2 节）。由于组织活检常用于诊断，因此首先必须满足病理医生的需求。若外科切除的组织较多或是非病理组织（如胎盘、脐带），则问题不大。

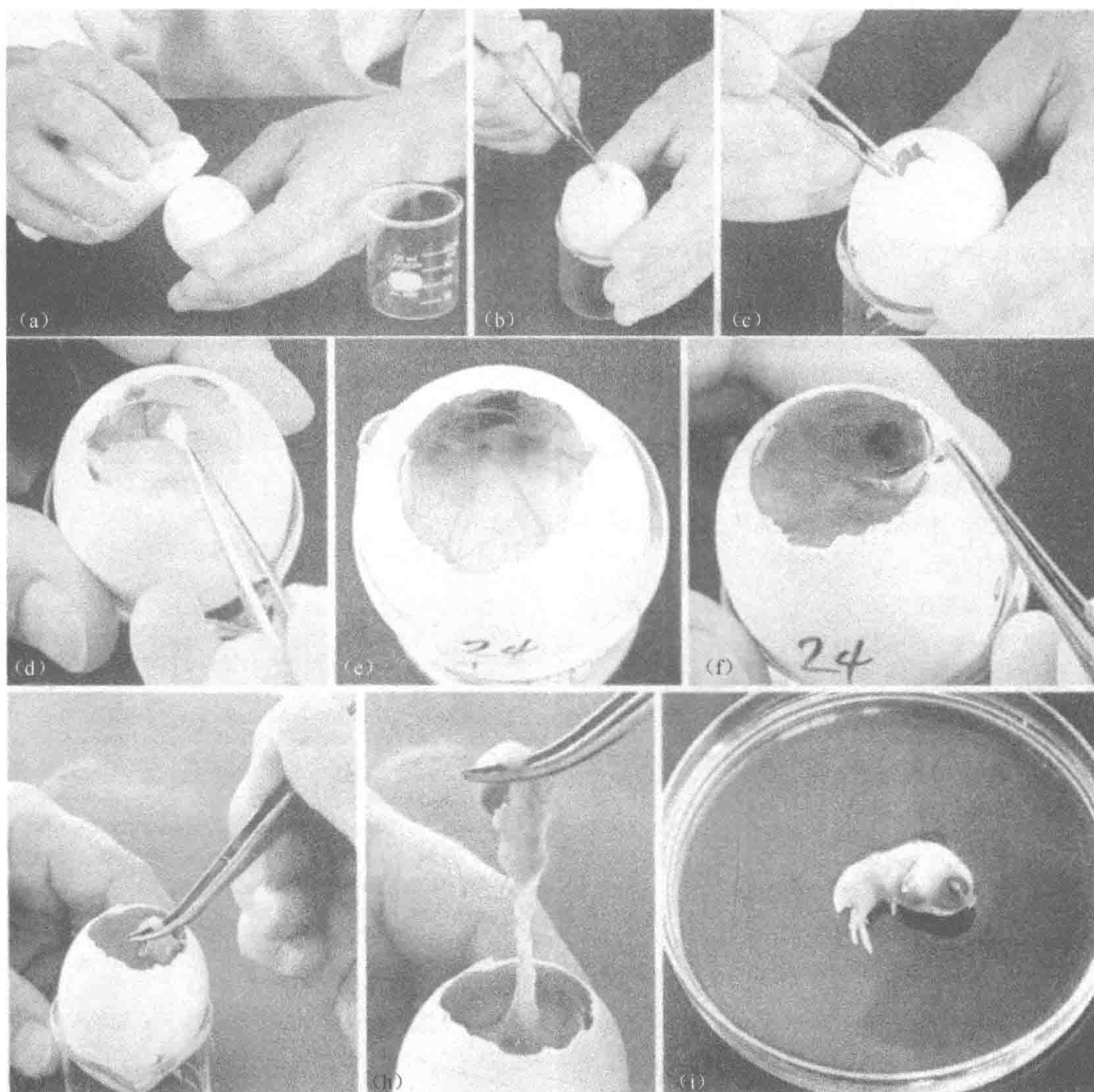


图 11.4 自鸡蛋中取出鸡胚。自鸡蛋中取出完整鸡胚的步骤：(a) 用乙醇消毒鸡蛋；(b) 敲破蛋壳；(c) 剥去蛋壳；(d) 剥去壳膜；(e) 绒毛尿囊膜（CAM）及血管；(f) 用镊子去掉 CAM；(g) 从颈部挑住胚胎；(h) 从蛋中取出胚胎；(i) 在培养皿中分离 10 天的胚胎

活检手术随时进行，不可能总是很方便地送入组织培养室，所以必须随时备有正规的收集和储存设备，当你或你的同事不在时可发挥作用。若已安排好送到实验室，则必须有接收样品的系统，详细记录样品来源、组织来源、病理等（参见 11.3.11 节），并通知操作者标本已送到，避免有价值的材料遭受损失。应当收集足够的标本，这样便可保留一个样品用于分析 DNA 序列谱型（参见 13.1.5 节），虽然血液样品可储存用于相同的目的。事实上，现已经这样做，但应该在同意书上声明（参见 6.9.2 节）。

▲安全提示 活检组织有感染危险（参见 6.8.3 节），故应按二级安全保护在 II 级生物危险箱内操作，所有培养基和器械用后必须经高压灭菌或用适宜的灭菌剂浸泡（参见 6.8.6 节）。应检测标本有无肝炎、HIV 和结核感染，除非患者已做过这些检查。

方案 11.3 人体活检组织的操作

概要

与医院人员协商，提供已标记的装有培养基的容器，安排好从手术室或病理医生处取样品。

材料

无菌

- 样品管（15~30mL）：带防漏盖子、装有半管含抗生素培养基（参见附录Ⅰ：取材用培养基），同时标明需求者的姓名、实验室地址及电话号码

操作步骤

1. 提供含收集培养基的容器，标注明确，送进手术准备室或病理实验室。
2. 做好准备，随时取材。
3. 手术后装入收集容器，或派人收集后迅速送达，并告知确切的切取时间。
4. 将样本送入培养室，样本应包裹 3 层（举例来说：组织放在密封管中，密封管放在密封的塑料袋内，以防止渗漏，再放在带内衬的信封里，上面标明需求者的姓名、地址及电话号码；见 20.6 节）。虽然储存时间越长，组织破坏越严重，但通常活检组织在 4℃条件下可存活至少 24h，甚至 3~4 天。
5. 将样品编号记录在手写笔记本中以备转入计算机数据库，或直接输入数据库。记录的编号应该纳入后续培养物的名称中，与病理号码或患者号码相连，这是与患者或捐赠者唯一的连接，患者的姓名或姓名的首字母都不能使用，对临床工作人员要保密。
6. 去除污染：虽然大多数手术标本取材时是无菌的，但在随后的处理中可能会产生问题。表皮组织（如皮肤、黑色素瘤）和胃肠道标本特别容易污染，即使皮肤活检前经过除菌清洗、肠道手术前用过非肠道抗生素。可以向医学微生物学家咨询在组织中可能存在的菌群，根据需要选择抗生素用于收集及解离标本。若手术标本很大（200mg 或再大），可置 70%乙醇中短暂浸泡（30s~1min），将有助于减少表面感染并避免损伤深部组织。

11.3 原代培养的类型

原代培养分离细胞有多项技术，可分为：①单纯机械法解离技术，包括用浸泡或不浸泡的方式解离；②应用酶的解离技术（图 11.5）。如果所取组织很小，则适于用原代外植法；如果组织较大，可用酶消化法以获得更多的细胞；软的组织适合于用机械法解离，一些硬的组织，如果产物的多少并不重要，或者从纤维间质组织分离松散黏附的细胞，也可用机械法分离。

11.3.1 原代外植

原代外植技术是由 Harrison（1907）、Carrel（1912）及其他致力于组织培养的人创建的。起

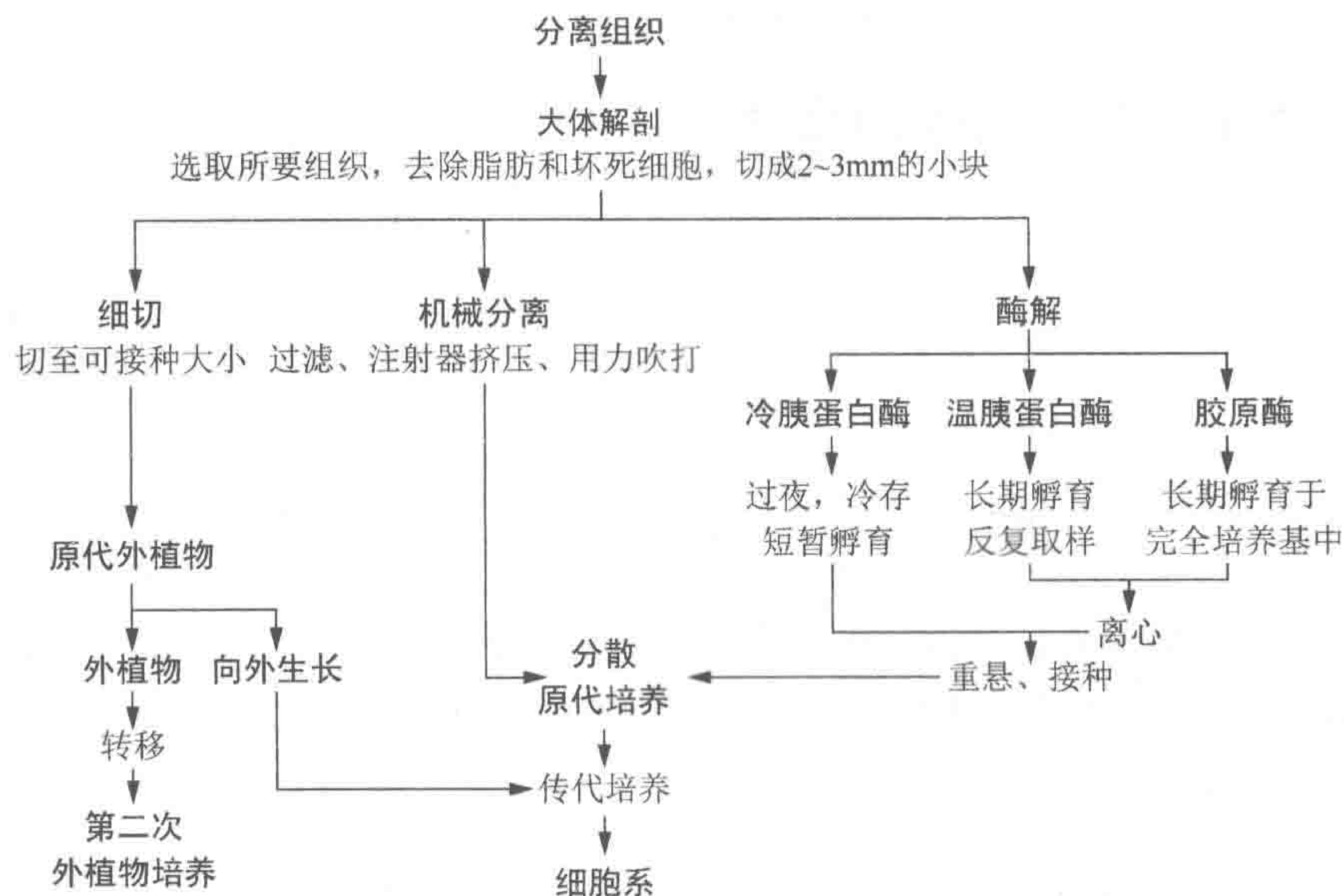


图 11.5 原代培养的选择。细胞系可通过多种途径获得：中间和左边的途径采用机械法解离细胞，右边采用的是酶解法。外植物可能可以转移再接种而再次向外生长，已经向外生长的细胞可进行传代培养而成为细胞系

初，将组织包埋于血浆或淋巴液中，再与异源血清或胚胎提取物混合，置于盖玻片上，将盖玻片翻过来盖在凹载玻片上。凝固的血浆使组织保存原位，外植物可通过常规显微镜观察。血浆凝固产生的异源血清、胚胎提取物连同血浆可以提供营养及生长因子，并可刺激外植物的细胞向外迁移。这项技术仍在应用，但大部分已被简化的方法所替代，如方案 11.4 中所描述（另见方案 25.9-Su 和 27.4 节用于培训的练习 19）。

方案 11.4 原代外植

概要


彩版 1


彩版 2

组织切碎并浸洗，组织块接种于培养瓶或皮氏培养皿的表面，加入少量含高浓度血清（40%~50%）的培养基，它产生的表面张力使标本保持原位（图 11.6），直到它们自发地贴附于表面，随后细胞开始生长（图 11.6b，彩版 1a、彩版 2b）。

材料

无菌或无菌制备

- 组织样品
- 生长培养基（如 DMEM 与 F12 等体积混合，再加 20%胎牛血清），100mL
- DBSS，100mL
- 9cm Petri 平皿，非组织培养级别，3 个
- 精细的镊子，2 对
- 手术刀，11#刀片，2 把

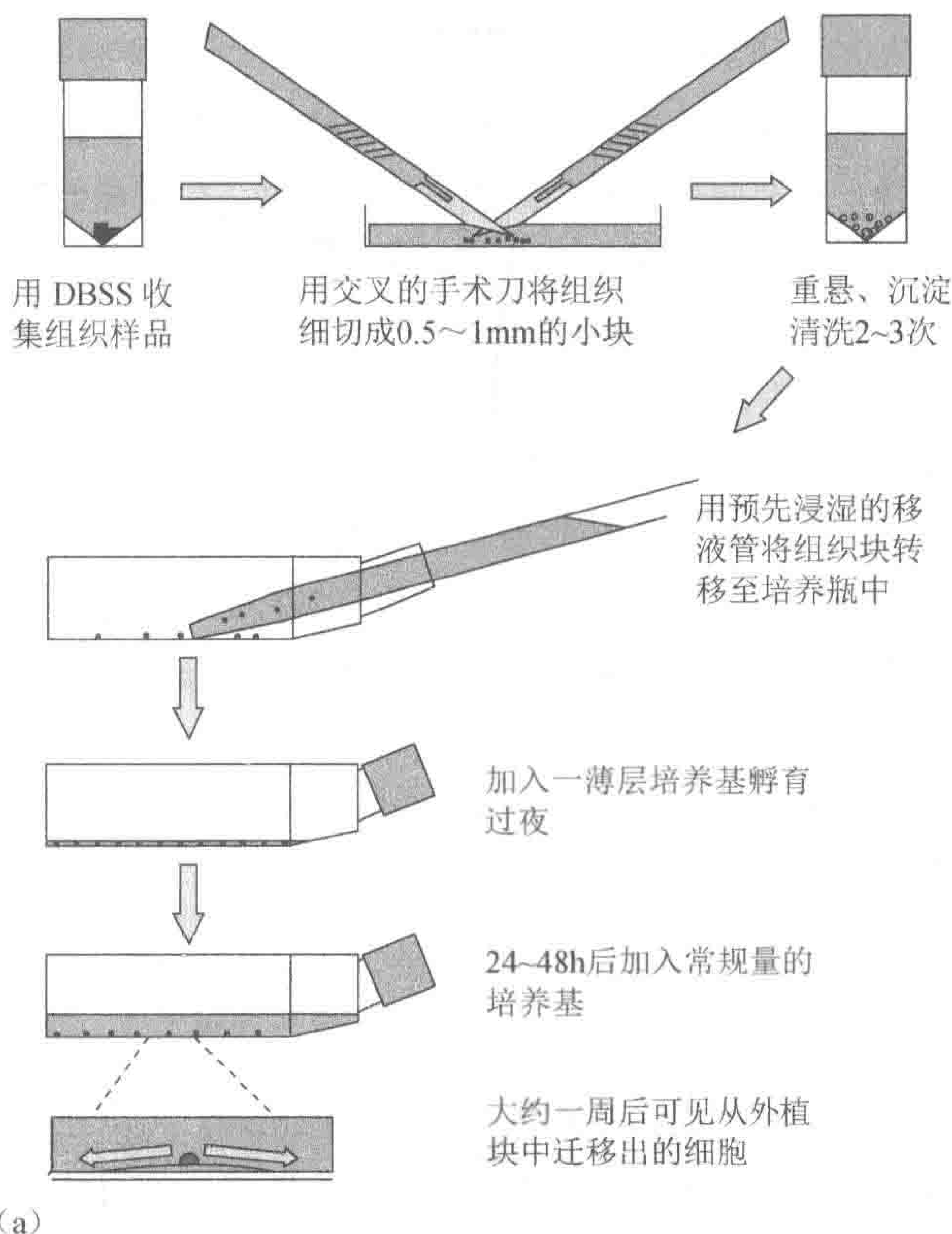
- 10mL 宽口移液器
- 15mL 或 20mL 离心管，或普通容器，2 个
- $25cm^2$ 培养瓶或 5~6cm 组织培养级别的 Petri 培养皿，5 个。瓶子的大小及生长培养基的使用量取决于所取组织的量，大约 100mg 组织用 5 个 $25cm^2$ 的培养瓶

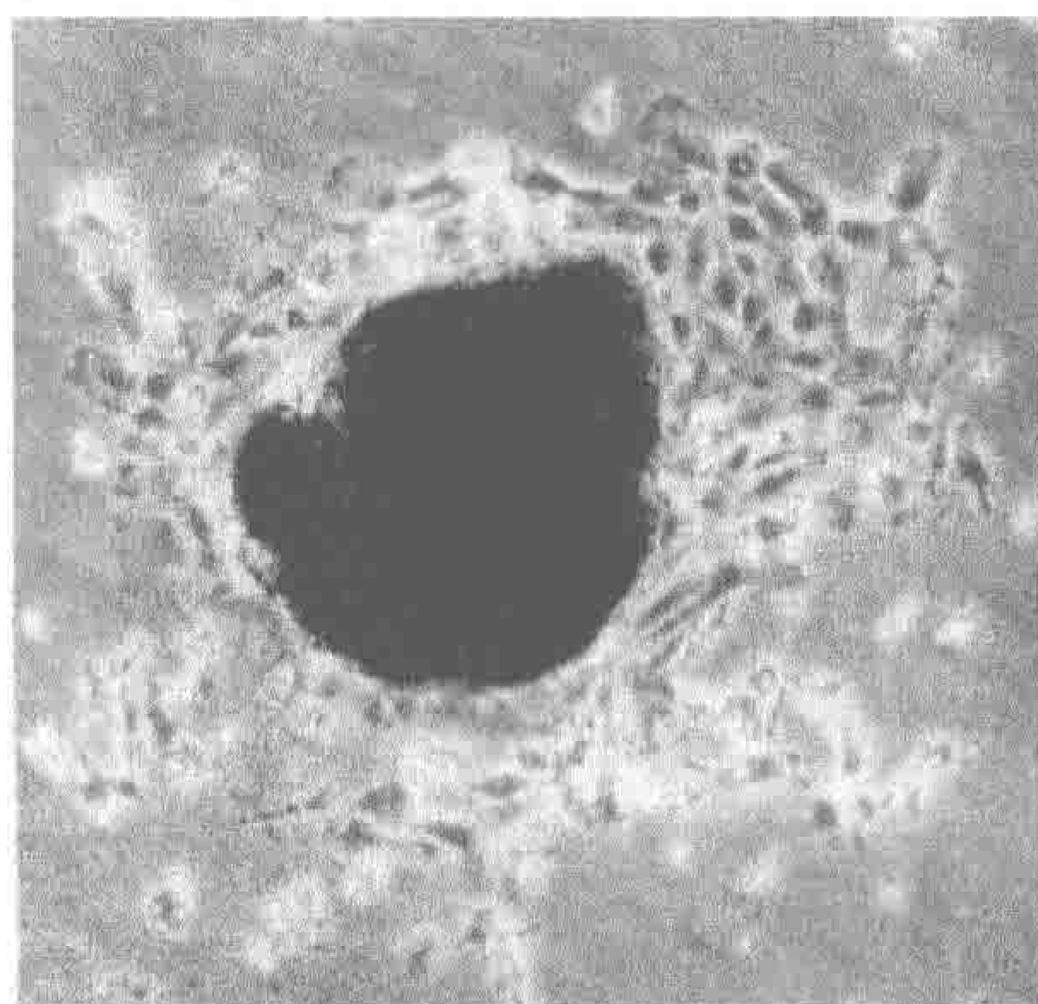
操作步骤

1. 将组织移入新鲜、无菌的 BSS 漂洗。
2. 移入第二个培养皿切除多余组织，如脂肪或坏死组织，再移入第三个培养皿。

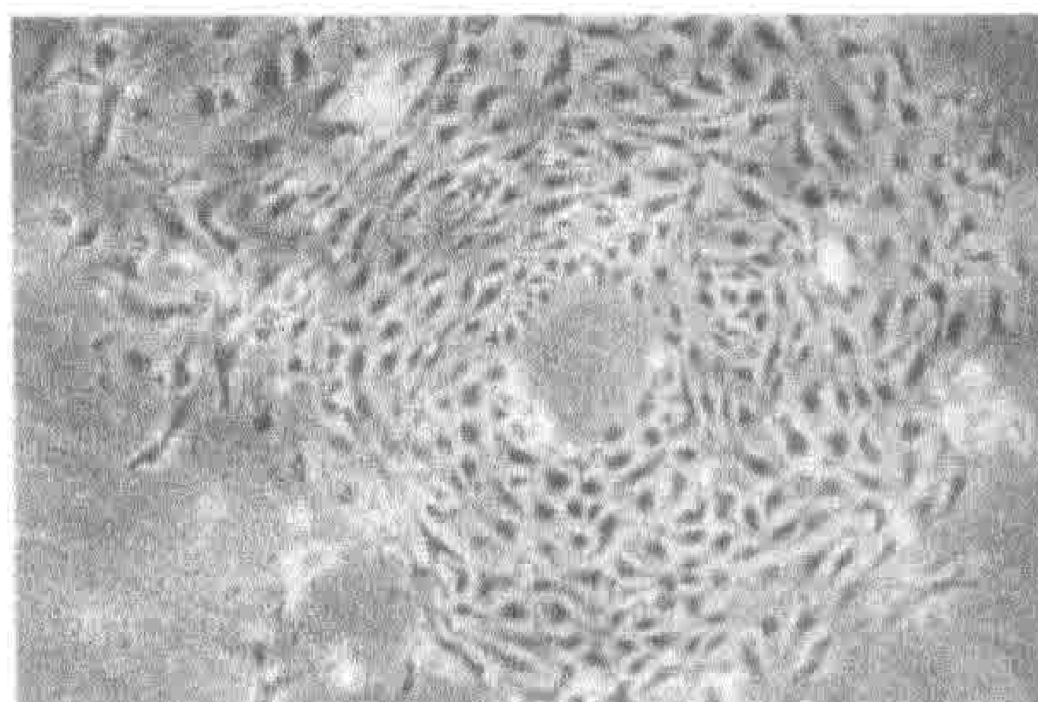
注意事项 带有少量血液、干净健康的组织块可能不需要转移两次，从转移培养基中转出后就可直接在第一个培养皿中切碎，转移培养基可以起到第一次清洗的作用。

3. 用手术刀交叉切成约 $1mm^3$ 的小块（图 11.6a 的上图）。





（b）



（c）

图 11.6 原代外植块培养。（a）原代外植块培养解离和接种操作步骤的示意图；（b）小鼠鳞状皮肤癌的原代外植培养；接种后大约 3 天，外植块及向外生长的早期情形（另见彩版 2b）；（c）接种后大约 7 天，去掉外植块后向外生长的细胞，10×物镜



彩版2

4. 用移液管（10~20mL 宽口吸头）将组织块移入 15mL 或 50mL 无菌离心管或普通容器内（先用 BSS 或培养基湿润吸管，否则组织块易黏在吸管的内壁）。
5. 让组织块静置沉淀。

6. 用 DBSS 重悬冲洗组织块后静置，去除上清液，重复该步骤两次或更多。如果只有少量血或坏死的组织，此步骤也许可省略。

7. 将组织块转移至培养瓶中（记住先湿润移液管），每个 $25cm^2$ 培养瓶接种 20~30 块组织。

8. 吸去多余液体，每 $25cm^2$ 生长面加入 1mL 的培养基，缓缓倾斜培养瓶将组织块均匀分布于生长面上。

9. 盖上瓶盖，放于培养箱或温室内，37℃培养 18~24h。

10. 第 2 天加入 1mL 培养基，这时组织块已经黏附于培养瓶的生长面。

11. 在未来 3~5 天将培养基逐渐加至 $5mL/25cm^2$。

12. 以后每周更换一次，直到细胞已稳定生长（图 11.6b）。

13. 一旦向外生长已形成，可用镊子将外植物取出（图 11.6c），用预先浸湿的移液管再转移至新的培养器皿中（回到步骤 7）。

14. 更换第一瓶的培养基直至细胞生长超过生长面积的一半，这时细胞也许可以传代了（参见方案 12.3）。

这项技术特别适用于小量组织的培养，如皮肤活检组织，因为机械或酶解作用可能造成细胞丢失，但此法的缺点是部分组织缺乏黏附性，以及向外生长的细胞具有选择性。尽管如此，事实上大多数细胞尤其取自胚胎的细胞，还是能够成功地向外迁移生长的。

外植物黏附 在外植物的上方放一玻璃盖玻片，将外植物置于盖玻片的边缘，这样可刺激外植物的黏附与外迁，或将外植物所贴附的塑料表面先行划痕以促进组织黏附（Elliget and Lechner，1992）（参见方案 25.9-Su）。用多聚赖氨酸或纤连蛋白（参见 7.2.1 节、9.4.3 节、13.2.1 节）、细胞外基质（参见方案 7.1）或饲养细胞层（参见方案 16.2.3）处理塑料制品表面也可促进黏附。历史上曾用血浆凝块促进黏附，可将血浆滴于塑料表面，埋入外植物。血浆可于数分钟内凝集，随后可加入培养基。同样，纯化的纤维蛋白原和凝血酶也可用于促进黏附（Nicosia and Ottinetti，1990）。

外植物传代 历史上，组织外植物常常传代至一个新的血浆凝块，促进它进一步向外生长，这个操作程序仍然可用于从小块组织回收最大量的细胞（参见方案 25.9-Su）。方案 11.5-Su 作为本章的补充材料提供，可用于将外植块传代使细胞产量最大化。

11.3.2 酶的解离作用

利用机械法和酶法解离组织时，可以避免细胞因迁移率而选择性生长的问题，可以在较短的时间内繁殖产生大量具有组织代表性的细胞。然而，正如原代外植技术可根据细胞的迁移作出选择，解离技术也同样可选择那些对蛋白酶及机械法有抵抗力的细胞。胚胎组织比新生或成年组织更易分离，并可产生更多的有增殖能力的细胞。随着年龄的增长，从中获得可有效增殖细胞的难度逐渐增大，其原因包括：细胞已开始分化、纤维结缔组织及细胞外基质增多、未分化的增殖细胞减少。对组织进行分离时，损害越严重（如长时间的胰蛋白酶消化、增加搅拌），组织越易被破坏成碎片，如纤维瘤很难在胰蛋白酶充分作用的情况下仍保持肿瘤细胞存活。

解离完成之后消化过程使用的酶可通过清洗细胞离心而去除，但如果活细胞的产量足够高，稀释细胞悬液至适宜的接种浓度可能也足以稀释酶的浓度。经洗涤后的残余活性可被培养基中的

血清中和，或在使用无血清培养基时，被其中的胰蛋白酶抑制物（如大豆胰蛋白酶抑制物）中和。

11.3.3 温胰蛋白酶消化

为了保持最大的细胞活性，很重要的一点是尽量减少胰蛋白酶对细胞的作用时间。当整块组织于 37℃的胰蛋白酶中消化时，已分离的细胞应每隔半小时收集一次，胰蛋白酶应离心去除，再用含血清的培养基中和（方案 11.6，另见 27.4 节用于培训的练习 19）。

方案 11.6 温胰蛋白酶解离组织

概要

组织切碎后于胰蛋白酶中搅拌数小时，每隔半小时收集已分离的细胞，离心后收集在含血清的培养基中（图 11.7）。

材料

无菌或无菌制备

- 组织，1~5g
- DBSS，50mL（参见附录Ⅰ）
- 2.5%胰蛋白酶（粗制，1∶250 或同等级别），用 D-PBSA 或正常生理盐水配制，100mL

注意事项 胰蛋白酶的批号不同，其特异的活性也会有改变，在选择正确的浓度之前，可能需要稀释一系列不同浓度的酶溶液并用特定的组织来测试一下。较纯级别的胰蛋白酶可以使用较低的浓度，如 0.01%~0.05%（参见 11.3.2 节）。

- D-PBSA，200mL
- 含血清的生长培养基（如 DMEM/F12 加 10%胎牛血清）
- 培养瓶，25cm^2，每克组织 5~10 个
- 9cm Petri 平皿，非组织培养级别，2 个
- 50mL 离心管或常规容器，2 个
- 胰蛋白酶消化用瓶子，250mL 锥形瓶 1 个（最好定做，如图 11.31）或搅拌瓶（参见图 12.7）
- 磁力搅拌子 1 个，于试管中高压消毒
- 弯头镊子，1 对
- 移液管（巴斯德，2mL、10mL）
- 100μL 可调节加样器，1 个

非无菌

- 1%萘黑，或 0.4%台盼蓝，5mL
- 磁力搅拌器，1 台

- 血细胞计数仪或细胞计数器，1个

操作步骤

1. 将组织移入加有新配制的无菌DBSS的Petri培养皿中，清洗。
2. 转入第二个培养皿中，切除多余组织如脂肪或坏死组织，再转移至第三个培养皿中。

注意事项 带有少量血液、干净健康的组织块可能不需要转移两次，从转移培养基中转出后就可直接在第一个培养皿中切碎，转移培养基可以起到第一次清洗的作用。

3. 用手术刀交叉切成约$3mm^3$小块（图11.3）。

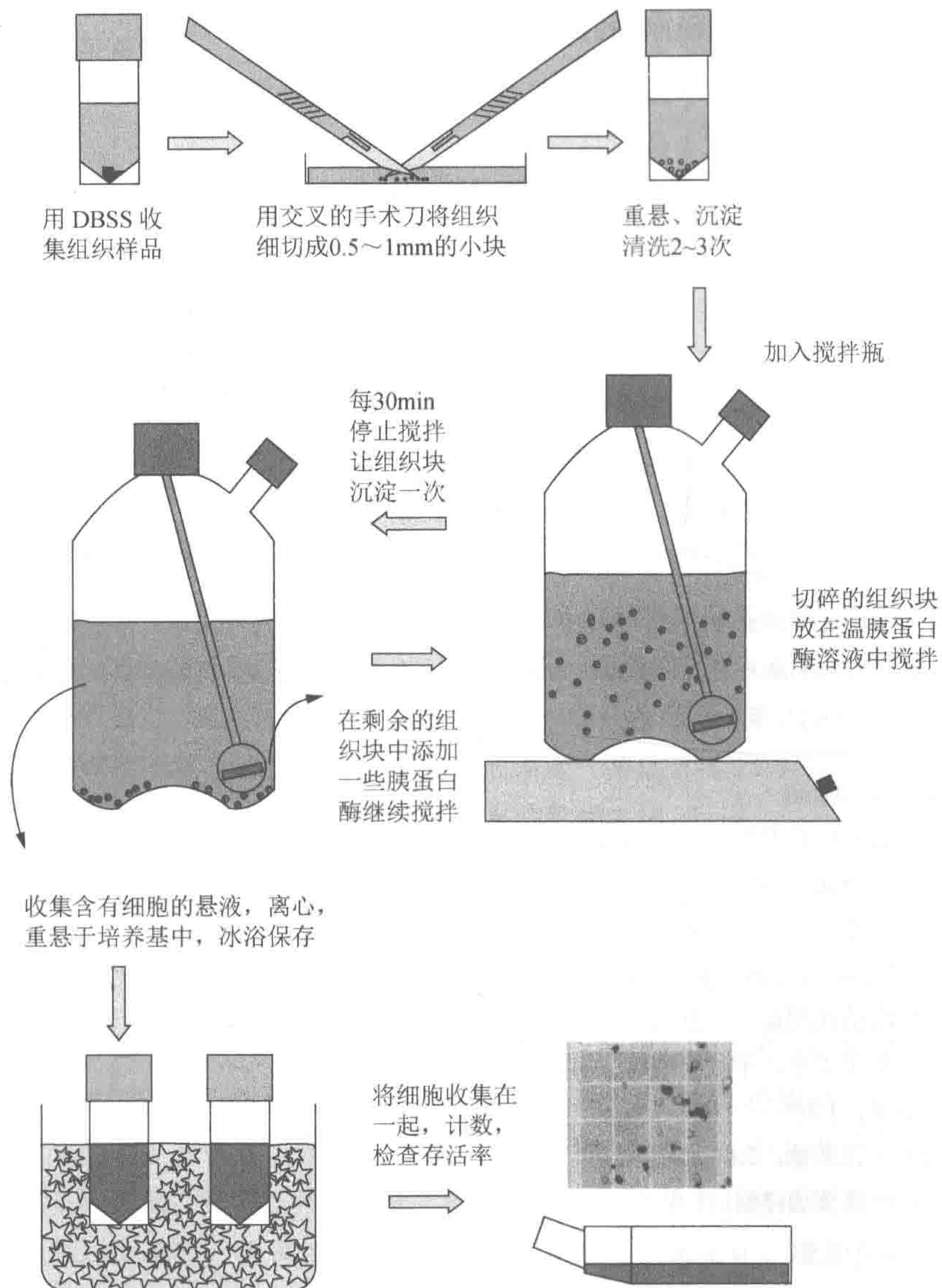


图11.7 温胰蛋白酶消化。粗切的组织于胰蛋白酶溶液中搅拌直至完全解离，每隔一段时间收集已解离的细胞，离心，重悬于培养基中，冰浴保存，最后收集在一起

4. 用弯头镊将组织移入离心管或常用容器内。

5. 让组织块沉降。

6. 用 DBSS 重悬清洗组织块，使组织块沉降，去除上清液，如此重复两次以上。如果只有少量血或坏死的组织，此步骤也许可省略。

7. 最后一次清洗之后重新悬浮组织块，用一个宽口移液管或倾倒转入一个空的胰蛋白酶消化瓶中。

8. 去除胰蛋白酶消化瓶中多余的液体，加入 180mL 的 D-PBSA。

9. 加入 20mL 2.5%的胰蛋白酶。

10. 在锥形瓶内加入搅拌子。

11. 封住锥形瓶，放于搅拌器上，在温箱或温室内于 37℃搅拌。

12. 每分钟大约 100 转，37℃搅拌 30min。

13. 30min 后，按下列步骤收集解离的细胞。

(a) 使组织块沉淀。

(b) 倒出上清液至离心管中，放于冰上。用无绒棉签蘸 70%乙醇小心擦去倾倒时流到锥形瓶侧臂外的所有培养基。

(c) 向锥形瓶中加入新的 0.25%胰蛋白酶溶液消化剩余的组织块，继续搅拌并孵育 30min。

(d) 将步骤 13 (b) 的细胞悬液以 500*g* 离心 5min，收集细胞。

(e) 用 10mL 含血清培养基重悬细胞团，储存于冰浴。

14. 重复步骤 11~13，直至组织块完全消化或已看不出进一步消化的迹象（3~4h）。

15. 将冷藏的细胞悬液倒在一起。

16. 用无菌纱布或专用的筛子（图 11.8）过滤，或让团块沉降而去除所有大的遗留的聚集物。

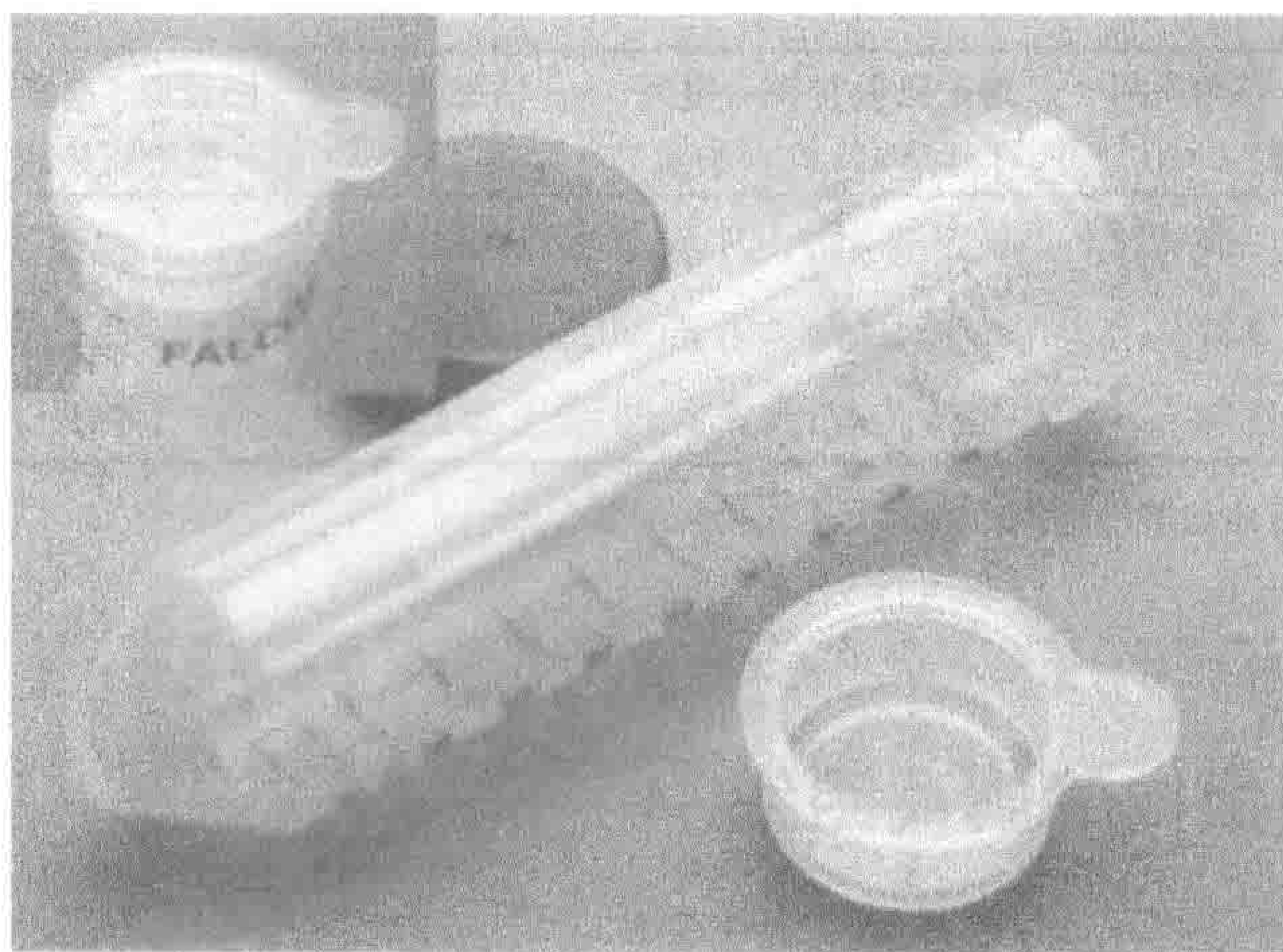


图 11.8 细胞滤器。一次性聚丙烯滤器和试管用于自原代悬浮物中过滤凝集物（Corning），也可用于分离较软的组织（另见图 11.13）

17. 用血细胞计数板或电子记数仪计数细胞（参见 23.1 节），如果细胞群体为异源性，使用电子计数仪时需要用血细胞计数板来确认其可行性（参见 24.3.1 节）及细胞聚集程度。

18. 将细胞悬液用生长培养基稀释，使每毫升培养基含有 1×10^5~1×10^6 个细胞。根据需要接种于多个培养瓶中，每平方厘米 2×10^4~2×10^5 个细胞。当存活率不明确或难以预知时，细胞计数意义不大（如肿瘤活检时，活检组织内死亡细胞的比例很高）。在这种情况下，建议按每毫升培养基 5~25mg 组织的浓

度接种。

19. 每隔一段时间更换一次培养基（2~4天，以 pH 下降为标准）。由于部分细胞黏附较慢甚至易于悬浮生长，因此丢弃上清液前要先检查上清液中是否含有活细胞。

温胰蛋白酶消化技术适于在相对短的时间消化大的组织，尤其对于整个小鼠胚胎或鸡胚。由于成年组织含有大量纤维结缔组织，故对成年组织效果不好，机械搅拌可损伤较敏感的细胞，如上皮细胞。如果离心和重悬时细胞又凝聚成团，可用 DNA 酶（10~20μg/mL）孵育 10~20min 后再离心。

11.3.4 低温预处理的胰蛋白酶消化

用胰蛋白酶消化组织的缺点之一是于 37℃条件下长期作用可损伤细胞，因此采用温胰蛋白酶消化法，每隔 30min 收集一次细胞，而不是将组织一直浸泡在胰蛋白酶中（3~4h）等待其完全消化。减小对细胞损害的简单方法是将组织浸入胰蛋白酶于 4℃放置 6~18h，在胰蛋白酶活性很小时浸透组织（表 11.2），37℃只需 20~30min 就可将组织消化（Cole and Paul，1966）（方案 11.7，另见 27.4 节用于培训的练习 19）。

表 11.2 采用温消化和冷消化处理 12.5 天胚胎的细胞产量

胰蛋白酶温度和作用时间		胰蛋白酶消化后			培养 24h 后	
4℃	37℃	每一胚胎所得细胞数（$\times10^{-7}$）	通过染色排除后得到存活率（%）（台盼蓝）	活细胞的总数（$\times10^{-7}$）	回收率（总接种细胞的百分比）	成活率（接种后存活细胞的百分比）
0h	4h	1.69	86	1.45	47.2	54.9
5.5h	0.5h	3.32	60	1.99	74.5	124.0[a]
24h	0.5h	3.40	75	2.55	60.3	80.2

a 大于 100%的数字意味着有些细胞已增加，数量大于失去的细胞

方案 11.7 冷胰蛋白酶解离组织

概要

剪碎的组织放在胰蛋白酶中，4℃放置 16~18h，去除胰蛋白酶后温育并于温培养基中分散细胞（图 11.9）。

材料

无菌或无菌制备

- 组织，1~5g

- 生长培养基（如 DMEM/F12，含 10%胎牛血清），100~500mL
- DBSS，100mL
- 0.25%粗制胰蛋白酶，溶于无血清的 RPMI1640 或 S-MEM，置于冰上，10~50mL

注意事项 胰蛋白酶的批号不同，其特异的活性也会有改变，在选择正确的浓度之前，可能需要稀释一系列不同浓度的酶溶液并用特定的组织来测试一下。粗制胰蛋白酶的特异性活性大约是 1000 BAEE U/mg，纯度较高的胰蛋白酶具有较高的特异性活性，使用时可以用较低的浓度，如 0.01%~0.05%（参见 11.3.2 节）。RPMI1640 和 MEM/Stirrer salts（S-MEM，如 Sigma-Aldrich M8167）不含有 Ca^{2+}，RPMI1640 的 Mg^{2+} 也减少。

- 9cm Petri 平皿，非组织培养级别，3 个
- 直头、弯头镊子，2 对
- 手术刀，11#刀片，2 把
- 25mL 或 50mL 带螺口盖的锥形瓶、离心管，或常用的容器，由于本操作程序要先将瓶子冷却，再将瓶子加温，故使用玻璃瓶更好。每克组织 1 个瓶子
- 25cm²、75cm² 培养瓶（根据需要选择大小和数量），5~10 个
- 移液管（巴斯德，2mL、10mL）

非无菌

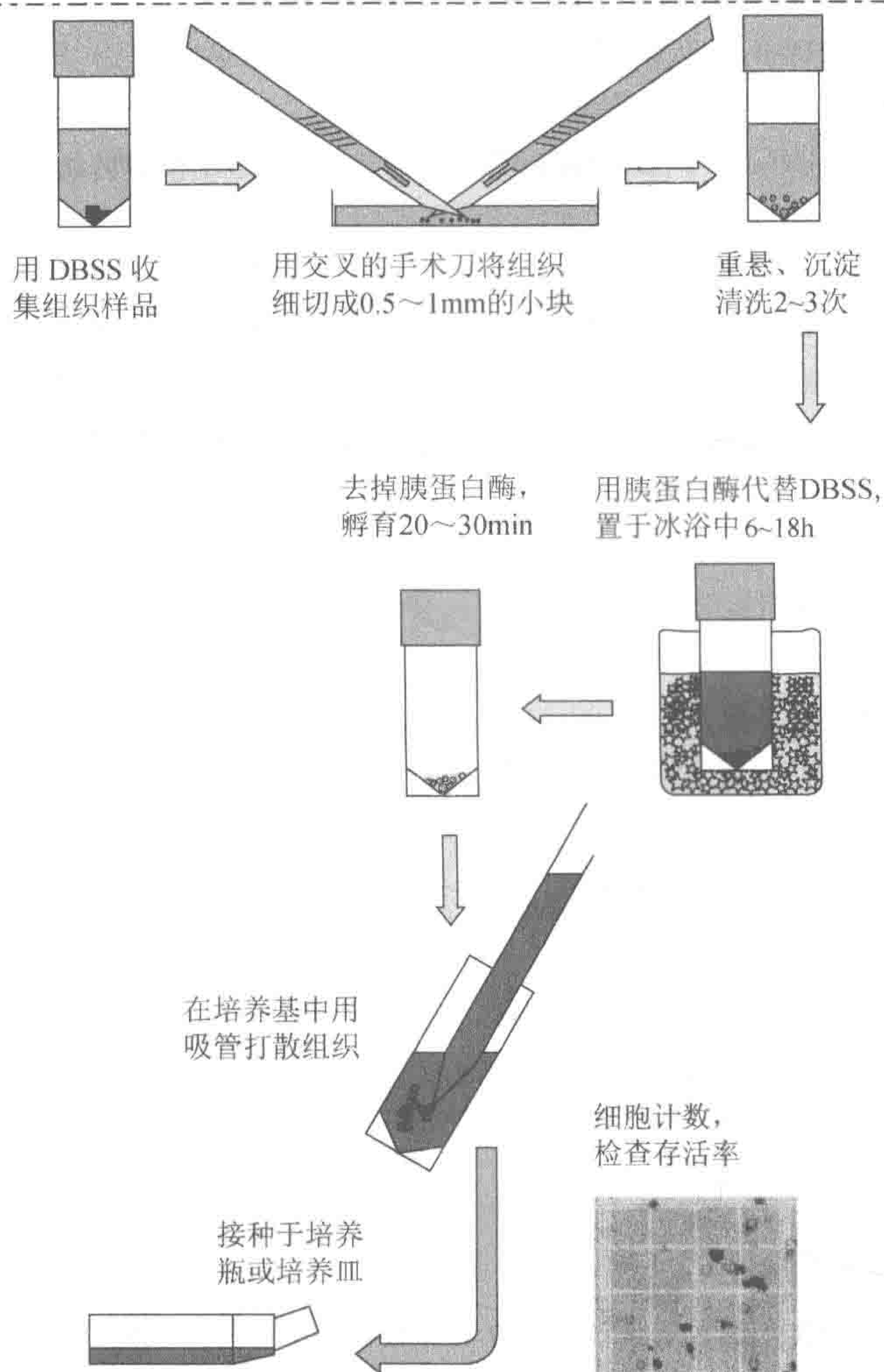
- 细胞活力染色: 1%萘黑，或 0.4%台盼蓝，1mL
- 冰浴，1 个

操作步骤

1. 将组织移入加有新配制的、无菌 DBSS 的 9cm Petri 培养皿中，清洗。
2. 转入第二个培养皿中，切除多余组织，如脂肪和坏死组织。
3. 转入第三个培养皿中，用交叉的手术刀细切成大约 $3mm^3$ 的小块（图 11.9）。胚胎的器官若小于 $3mm^3$，可全部保留。

注意事项 带有少量血液、干净健康的组织块可能不需要转移两次，从转移培养基中转出后就可直接在第一个培养皿中切碎，转移培养基可以起到第一次清洗的作用。

4. 用弯镊子将组织块移入一个玻璃锥形瓶、离心管或常规容器内。
5. 让组织块沉降。
6. 用 DBSS 重悬清洗组织块，沉降后去除上清，重复此步骤两次以上。如果只有少量血或坏死的组织，此步骤也许可省略。
7. 小心去除剩余液体。
8. 每克组织加入 10mL 溶于 RPMI1640 或 S-MEM 的 0.25%胰蛋白酶，置于 4℃。
9. 4℃放置 6~18h（处理时间依据组织而有所改变）。
10. 小心吸去胰蛋白酶，余下组织及残余胰蛋白酶。



彩版 2

彩版 3

图 11.9 冷胰蛋白酶消化。另见彩版 2a、彩版 2d、彩版 2e 和彩版 3

11．37℃放置 20~30min。

12．加入温培养基，大约每 100mg 初始的组织加 1mL，轻轻上下吸打混合物至组织完全分散开。

13．若部分组织未分散，细胞悬液可用无菌的平纹纱布或不锈钢筛（100~200μm），或一次性使用的塑料筛滤网（图 11.8）过滤，或者简单地让大的组织块沉降。当有较多组织时，可于每克组织多加入 20mL 培养基促进沉淀和随后收集悬液中的细胞，通常 2~3min 就足以去除大多数的较大块组织。如果是一大团组织不易分开，可能是由于 DNA 的凝集作用，也许可加入 10~20μg/mL 的 DNA 酶，作用 10~20min，使其散开。

14．用血细胞计数板或电子计数仪测定悬液的细胞浓度（参见 23.1 节），检查活细胞比率（参见方案 24.1）。细胞群体为异源性，因而初次使用电子计数仪时，需要用血细胞计数板来确认，也可用它确定细胞存活力。

15．将细胞悬液用生长培养基稀释，使每毫升培养基含有 1×10^5~1×10^6 个细胞。根据需要接种于多个培养瓶中，每平方厘米 2×10^4~2×10^5 个细胞。当存活率不明确或难以预知时，细胞计数意义不大（如肿瘤活检时，活检组织内死亡细胞的比例很高）。在这种情况下，建议按每毫升培养基 5~25mg 组织的浓

度接种。

16. 间隔一定时间更换一次培养基（2~4天，以pH下降为标准）。由于部分细胞黏附较慢甚至易于悬浮生长，因此丢弃上清前要先检查上清液中是否有存活的细胞。

与温消化相比，冷消化可获得较高的细胞存活率，培养24h后生存率也提高(图11.1、图11.10，表11.2)，同时可保留更多的细胞种类（彩版2d、e，彩版3）。经冷消化处理的小鼠胚胎培养物含有更多的上皮细胞；13天胚鼠的肝经冷消化获得的红系细胞培养物可对促红细胞生成素发生反应，而经热消化或机械分离后的则不发生反应（Cole and Paul，1966；Conkie，私人通信）。冷消化也很方便，因为不用搅拌和离心，在4℃条件下过夜即可。然而，这种方法受限于一次可处理的组织量。


彩版2


彩版3

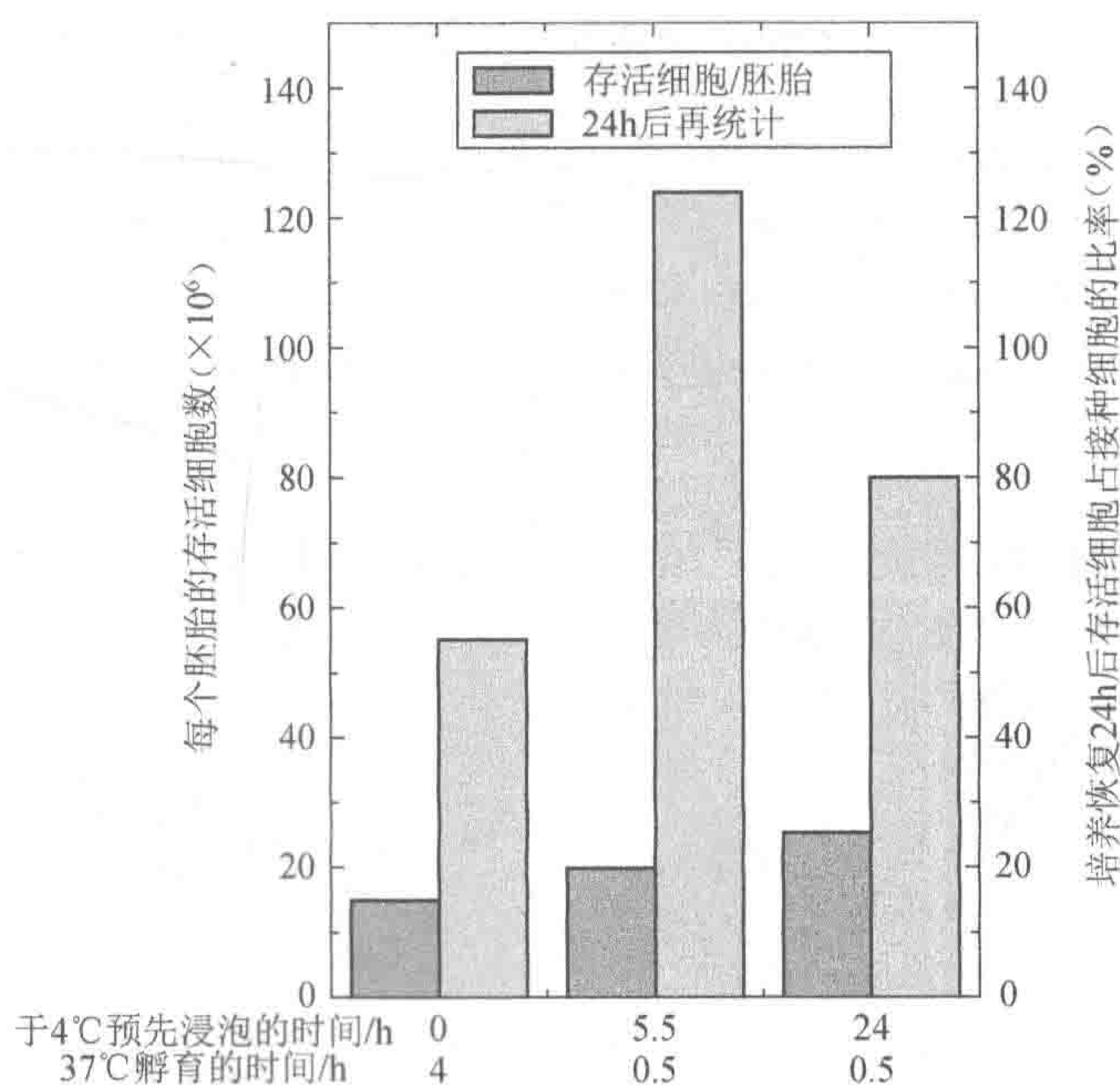


图11.10 温胰蛋白酶消化和冷胰蛋白酶消化。每个12.5天胚胎用温胰蛋白酶消化和冷胰蛋白酶消化所获得的存活细胞量，用冷胰蛋白酶在4℃作用24h的活细胞产量增加，但经过24h培养后，用冷胰蛋白酶短时间作用的活细胞比率最高（大于100%，意味着细胞增殖），这可能是由于是经过长时间冷胰蛋白酶作用后释放出的细胞不能够增殖

11.3.5 鸡胚器官原基

冷消化尤其适用于小量组织，如胚胎器官。以10~13天的鸡胚为材料，按方案11.7可得到几种不同类型、具有组织特性的可繁殖培养物。此方案可用作教学培训练习（方案11.8，参见27.4节练习19）。

3~5天后，心脏培养物中可见能收缩的细胞，视网膜色素层培养物中出现色素细胞集落，融合的肌管则开始出现于骨骼肌培养物中。培养物可经固定、染色（参见方案18.2），用于进一步的实验。

方案 11.8 鸡胚器官原基

概要

切出单一器官或组织，最好是整个置于冷的胰蛋白酶中过夜，去除胰蛋白酶，短暂孵育器官或组织，在用于培养的培养基中分散细胞，稀释并接种。

材料

无菌

- DBSS，100mL
- 粗制胰蛋白酶，0.25%，以 RPMI1640 或 S-MEM 配制，置于冰上，20mL

注意事项 胰蛋白酶的批号不同，其特异的活性也会有改变，在选择正确的浓度之前，可能需要稀释一系列不同浓度的酶溶液并用特定的组织来测试一下。粗制胰蛋白酶的特异性活性大约是 1000 BAEE U/mg，纯度较高的胰蛋白酶具有较高的特异性活性，使用时可以用较低的浓度，如 0.01%~0.05%（参见 11.3.2 节）。RPMI1640 和 MEM/Stirrer salts（S-MEM，如 Sigma-Aldrich M8167）不含有 Ca^{2+}，RPMI1640 的 Mg^{2+}也减少。

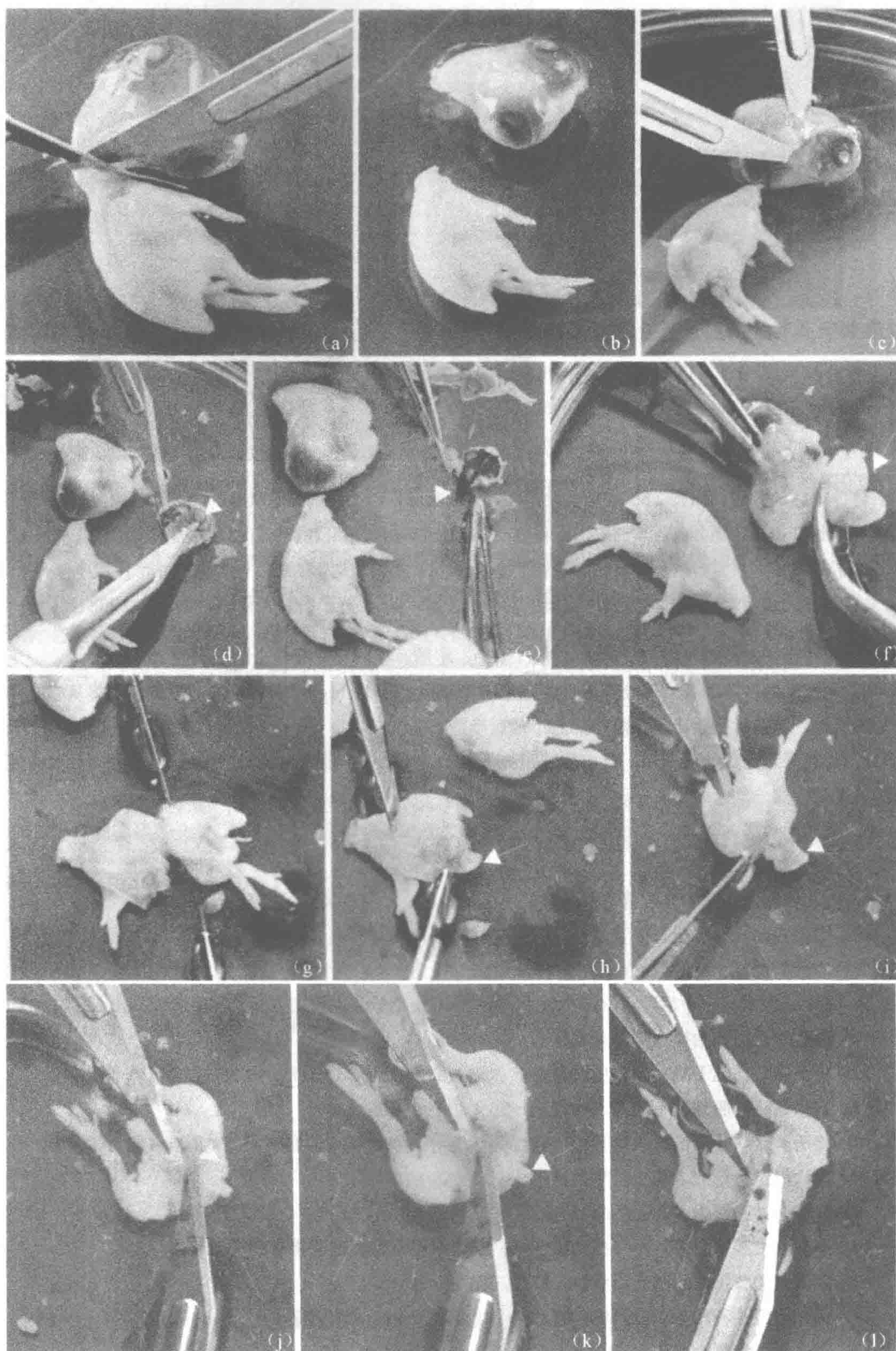
- 培养基（DMEM/F12，加 10%胎牛血清），每块组织至少用 12mL，200mL
- 9cm Petri 培养皿，非组织培养级别，3 个
- 25cm² 培养瓶（每种组织用 2 个），20 个
- 手术刀（多数步骤用 11 #刀片），2 把
- 用于细切的虹膜刀，2 把
- 直头、弯头尖镊子，1 对
- 移液管（巴斯德，2mL、10mL）
- 10~15mL 有螺口盖的试管，最好是玻璃的，10 个

非无菌

- 有胚胎的鸡卵，孵化 10~13 天，3 个
- 冰浴，1 个
- 双筒解剖显微镜

操作步骤

1. 如前所述（参见方案 11.2）取出胚胎，放入无菌的 BSS 中。
2. 除去头部（图 11.11a、b）。
3. 切取一个眼球，小心剖开后清除晶状体、房水、玻璃体（图 11.11c、d）。
4. 用两把尖镊子夹住视网膜，轻轻将色素层与神经层及结缔组织分开（图 11.11e）。此步骤如果用 10 天的胚胎需要用解剖镜。用 0.25%胰蛋白酶及 1mmol/L 的 EDTA 溶液短暂浸泡可促使两组织易于分离。将分离的组织放于一侧。


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)

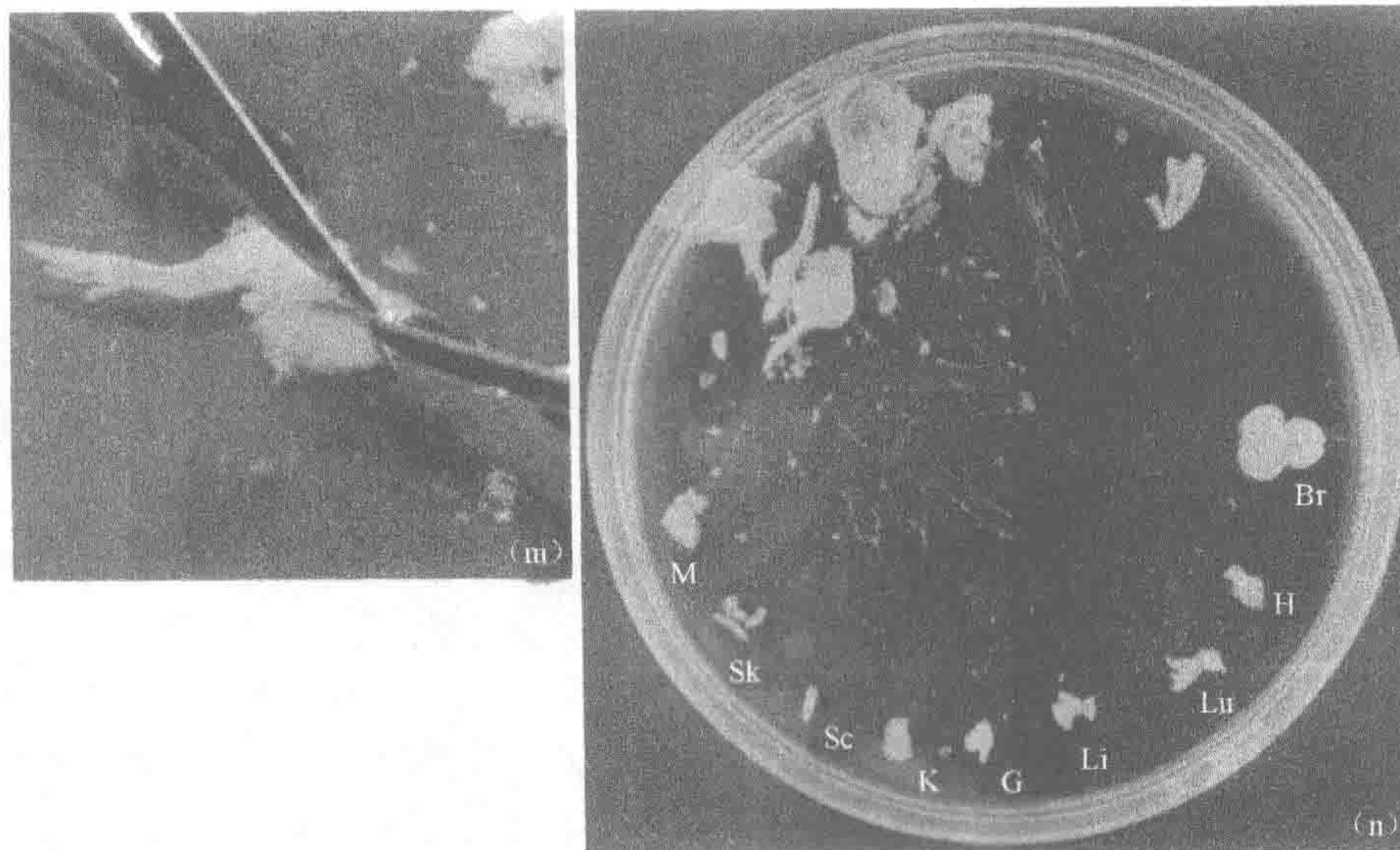


图 11.11 鸡胚的分离。(a)、(b) 切取头部；(c) 切取眼球；(d) 解剖出晶状体；(e) 剥离视网膜；(f) 取出脑；(g) 切开躯干；(h) 自前半部取出心和肺；(i) 自后半部取出肝和肠；(j) 刀尖插入左肾和背部体壁之间；(k) 挤出脊髓；(l) 自躯干背部和后腿剥下皮肤；(m) 自大腿切下肌肉；(n) 器官雏形按顺序排列于皿的周围，从右侧按顺时针方向，收集了脑、心、肺、肝、砂囊（胃)、肾、脊髓、皮肤和肌肉

5. 用弯镊子刺破颅顶用勺取出脑（图 11.11f)，将脑、视网膜一起放于皿的一侧。

6. 从躯干的中间断开，此处肝透过腹壁显出粉红色（图 11.11g)，若切在膈的位置，则将从心脏和肝之间通过，但有时肝会出现在前半部而不是后半部。

7. 轻轻探入切面的前半部，取出心脏和肺（图 11.11h，挑出器官，确认后再切)，把分离后的心脏和肺放于皿中的一侧。

8. 探入后半部，取出肝，由于肠夹于肝的两叶之间可一并取出（图 11.11i)，分离肝和肠放于皿的一侧。

9. 折回体壁显露后半体腔背侧面的内壁，可见长的小叶状的肾并行排列于中线两侧。

10. 用刀尖轻轻地滑至肾的背面，使肾自躯体背面内侧壁剥离（图 11.11j)（此步骤如果用 10 天的胚胎需要用解剖镜)，小心将肾分离放于皿的一侧。

11. 将两把手术刀置于后部末端的中线上，尖端向前，交替前进像挤牙膏一样将脊髓挤出（图 11.11k)（此步骤若用 10 天的胚胎操作可能有难度)。

12. 将胚胎后部躯干翻转，将皮肤自背部和腿上部撕脱（图 12.11l)，收集皮肤放于一侧。

13. 自每条腿的股部切下肌肉，收集到一起（图 11.11m)。

14. 将所有这些收集的组织及其他所需要的任何组织分别转入含 1mL 0.25%胰蛋白酶的试管中，放于冰上，确认组织块已沉入胰蛋白酶溶液中。

15. 将这些试管置于 4℃放置 6~18h。

16. 小心吸去胰蛋白酶，不要搅动组织块；振动或慢慢旋转试管将有助于消化。

17. 用剩余的胰蛋白酶孵育组织块，37℃，15~20min。

18. 每种组织接种两个 25cm^2 培养瓶，每个培养瓶加 4mL 的培养基。

19. 向含组织和剩余胰蛋白酶的试管中加入 2mL 的培养基，轻轻上下吸打分散组织。

20．让大块组织沉淀。

21．将含有细胞的上清吸入第一个培养瓶中，混匀，将1mL稀释的悬液移入第二个培养瓶。这样做使得两瓶的细胞密度不同，可免去细胞计数，从而可确定细胞的适宜浓度，用于以后的实验。

22．按需要更换培养基（如脑于24h后更换；视网膜色素层则保持5~7天），并检测形态学特点和功能。

11.3.6 其他酶解过程

胰蛋白酶的消化作用可造成损伤（如对一些上皮细胞）或无效（对于多种纤维组织，如纤维结缔组织），故可试用其他酶类（参见表11.1）。由于细胞外基质常含有胶原，尤其在结缔组织和肌肉中，显然应选择胶原酶［Freshney，1972（结肠癌）；Speirs et al.，1996（乳腺癌）；Chen et al.，1989（肾），Booth and O'Shea，2002（肠），Heald et al.，1991（胰岛细胞）］。其他的细菌蛋白酶，如链霉蛋白酶（Glavin et al.，1996；Schaffer et al.，1997）和裂解酶（Roche）（Compton et al.，1998；Inamatsu et al.，1998）也被不同程度地应用。Liberase（Roche）是一种鸡尾酒式的酶（中性蛋白酶与胶原酶或嗜热菌蛋白酶的混合物），已用于分离肝中的肝细胞（参见方案25.6-Su）和胰腺中的胰岛细胞（Anazawa et al.，2009）。由于糖参与细胞外黏附，因此也将透明质酸酶（Berry and Friend，1969）、唾液酸酶与胶原酶或胰蛋白酶联合使用（Brienńo-EnrÍquez et al.，2010）。市场上还不断地出现其他蛋白酶（参见11.1节和表11.1），若胰蛋白酶、胶原酶、裂解酶、链霉蛋白酶、透明质酸酶和DNA酶单独或联合作用均无效时，寻找其他有效的试剂是唯一选择。

11.3.7 胶原酶

此方法（方案11.9）简单而且对许多组织有效，如胚胎的、成年的、正常的或恶性的，尤其适用于含有大量纤维成分，但又对胰蛋白酶非常敏感而不能使用胰蛋白酶消化的组织。常用的是粗制胶原酶，它的一些活性也许依赖于其他非特异蛋白酶的存在。倘若非特异的蛋白水解活性有不良作用，可用高纯度的胶原酶，但也许不如粗制的胶原酶有效。

方案 11.9 胶原酶解离组织

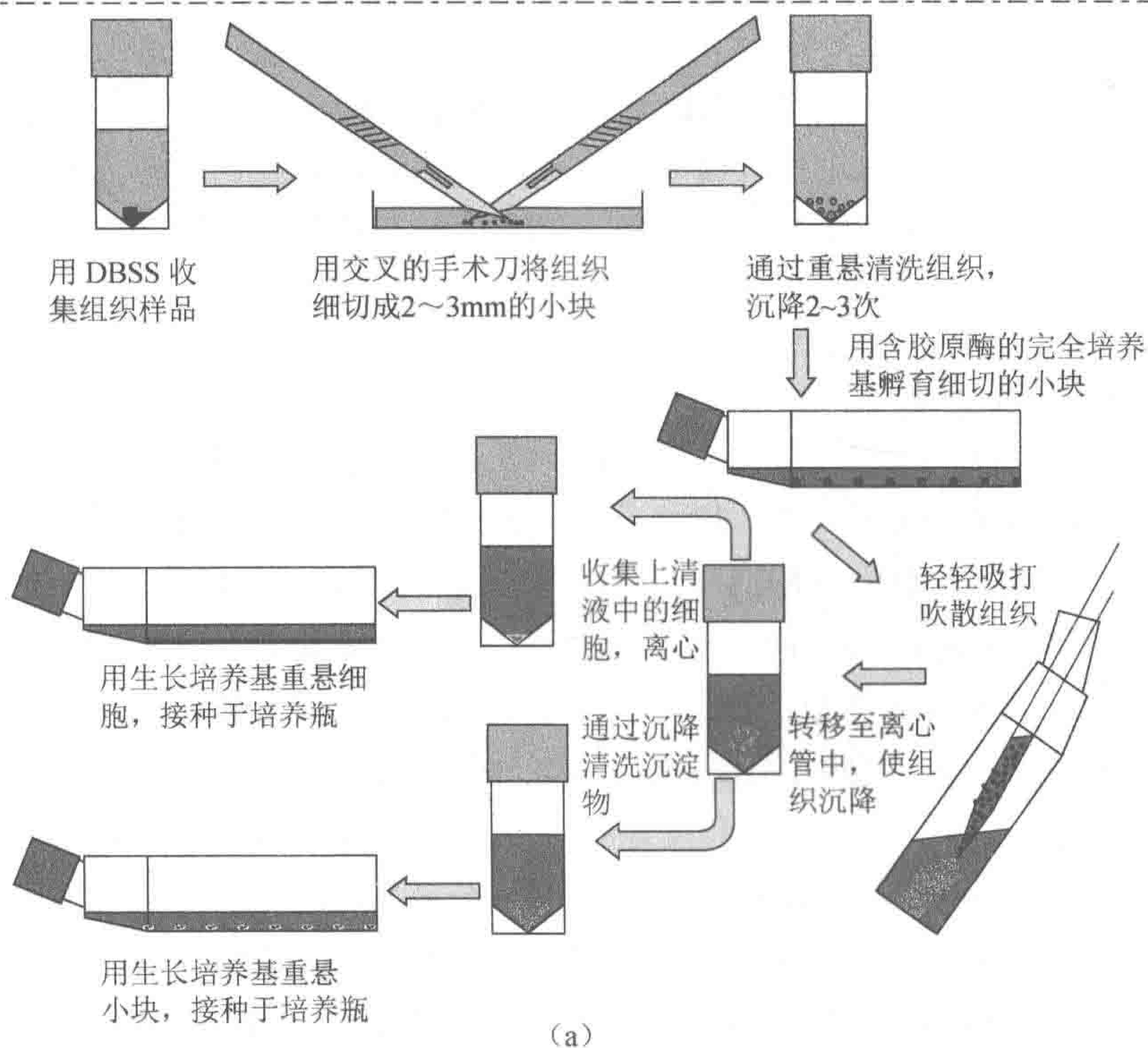
概要

切碎的组织放于含有胶原酶的完全培养基中孵育，组织分解后，通过离心去除胶原酶，高浓度接种、培养（图11.12）。

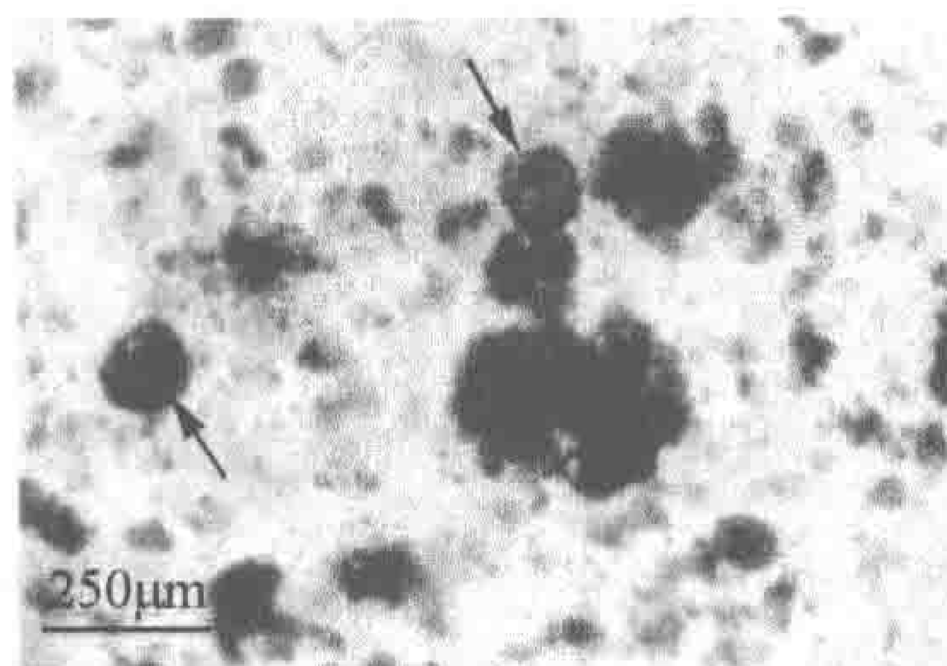
材料

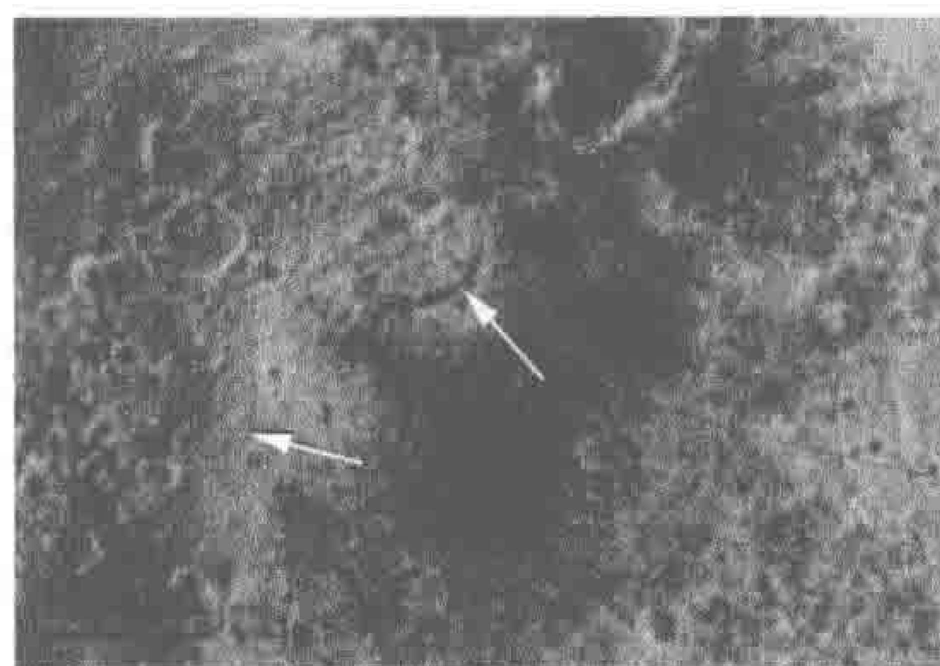
无菌

- 胶原酶（2000U/mL），Worthington CLS或Sigma 1A（选择批次），5mL
- 用于培养的培养基，如DMEM/F12加10%胎牛血清，100mL



（a）





（b）（c）

图 11.12 用胶原酶解离组织。（a）用胶原酶解离组织的示意图；（b）用粗制胶原酶（Worthington CLS 级别）解离 48h 后的人结肠癌的细胞团，去除胶原酶之前，箭头所指可能是上皮细胞团；（c）与（b）相同，但是在去除胶原酶之后继续用吸管吹打分离，并培养了 48h。在（b）中边界清楚的圆形细胞团块（黑色箭头所指）形成（c）中的上皮样细胞层（白色箭头所指），有些细胞团仍然是三维的，有些已铺开成片；较不规则的细胞团块得到的是成纤维细胞（另见彩版 2c）



彩版2

- DBSS，100mL
- 移液管，1mL、10mL
- 9cm Petri 平皿，非组织培养级别，3 个
- 25cm^2 培养瓶，6 个
- 离心管或常规容器，15~50mL，3 个
- 手术刀（11#刀片），1 对

非无菌

- 离心机

操作步骤

1. 将组织移入新鲜、无菌的 DBSS 中，清洗。

2. 转入另外一培养皿，切除多余组织，如脂肪或坏死组织。

3. 将组织转移至第 3 个平皿中，用交叉的手术刀细切成大约 $1mm^3$ 大小（图 11.12）。

4. 用移液管（10~20mL，广口）将组织移入 15mL 或 25mL 无菌离心管或常用的容器中（先用 DBSS 湿润移液管，否则组织块易贴壁）。

5. 让组织块沉降。

6. 用 DBSS 重悬清洗组织，组织块沉降后，去除上清液，重复此步骤两次以上。

7. 将 20~30 个组织块接种于一个 $25cm^2$ 的培养瓶中，另一瓶中接种 100~200 块。

8. 吸净 DBSS，每瓶中加入 4.5mL 含血清（如果需要）的生长培养基。

9. 加入 0.5mL 粗制胶原酶（2000U/mL），终浓度为 200U/mL。

10. 于 37℃培养 4~48h，无需振荡。肿瘤组织（如乳腺或结肠的硬癌）由于分解较慢，可作用 5 天或更长时间。有时由于时间过长，pH 过度下降（pH<6.5），需要将组织离心并用新的培养基和胶原酶重悬。

11. 轻轻晃动培养瓶检查分离情况：组织块呈点状分布于培养瓶底部，温和地吹打后分散成单一细胞或小的组织块（图 11.12b）。

12. 有些组织（肺、肾、结肠或乳腺癌）的部分上皮细胞小团块对胶原酶耐受，沉降 2min 后可将它们从剩余液体中分离出来。若将其用 DBSS 重悬，沉淀后将沉淀物接种于培养基中，将形成生长旺盛的上皮细胞岛。上皮细胞往往在未完全解离时存活较好。

13. 组织完全分解或组织块沉降后，收集上清液中的细胞，于 50~100*g* 离心 3min。

14. 去除 DBSS 或培养基上清液，重悬，加入 5mL 培养基，接种于 $25cm^2$ 培养瓶中。若胶原酶作用时 pH 下降了（48h 之前达到 pH<6.5 或更低），去除胶原酶后用 2~3 倍培养基稀释细胞悬液。

15. 48h 后更换培养基。

部分细胞，尤其是巨噬细胞，在胶原酶孵育时可贴附于第一个培养瓶。因此在胶原酶作用（并除去胶原酶）后，将细胞移入新的培养瓶可除去许多巨噬细胞。若有需要，第一瓶还可继续培养。轻度胰蛋白酶消化可去除巨噬细胞以外的其他贴附细胞。

已证实胶原酶适合于消化人类肿瘤（Pfragner and Freshney，2004）、小鼠肾、人肾（Valente et al.，2011），以及成人或胚胎脑组织、肝（参见方案 25.6-Su）、肺及许多其他组织，尤其是上皮组织（Freshney and Freshney，2002）。此过程作用缓和，无需机械振荡和特殊设备。但对于大于 1g 的组织，则消化时间过长，费用也太高，因为需要大量的胶原酶。胶原酶可解离大多数结缔组织，但存在成纤维细胞过度生长的问题，故需要再进行选择性培养（参见 9.2 节）或进行细胞分离（参见第 17 章）。

用胶原酶分解（参见方案 11.8 的步骤 11）或用胰蛋白酶冷消化（参见彩版 2 和彩版 3）产生的上皮细胞团块，可在解剖镜下挑选分离并转入微量滴定板的各个小孔内，单独培养或与经照射、丝裂霉素处理过的滋养细胞共同培养（参见 16.2.3 节、25.2.1 节、25.2.4 节）。


彩版 2


彩版 3

11.3.8 机械法解离

从原代外植物长出细胞是很慢的过程，并有高度选择性，事实上仅适用于少量组织。利用酶

进行消化，尽管可能获得更具组织代表性的细胞群，但工作量相当大，同时在酶消化过程中存在损伤细胞的危险，故许多人更喜欢选择机械分离法。例如，收集小心切、刮组织时溢出的细胞（Lasfargues，1973）；加压使组织通过筛孔尺寸逐渐减小的筛网；迫使组织块通过注射器（用或不用大规格的针头）（Zaroff et al.，1961）或只是简单地反复吹打（图 11.13）。这种操作比酶消化更快，但可产生机械损伤。切碎溢出法（图 11.13a）和筛网法（图 11.13b）是比较温和的机械法，而用吸管打碎（图 11.13d），特别是用注射器吹打（图 11.13c）具有相当大的切割力。方案 11.10 所描述的是机械分离法的一种，对于较软的组织（如脑），这是一种成功的方法。

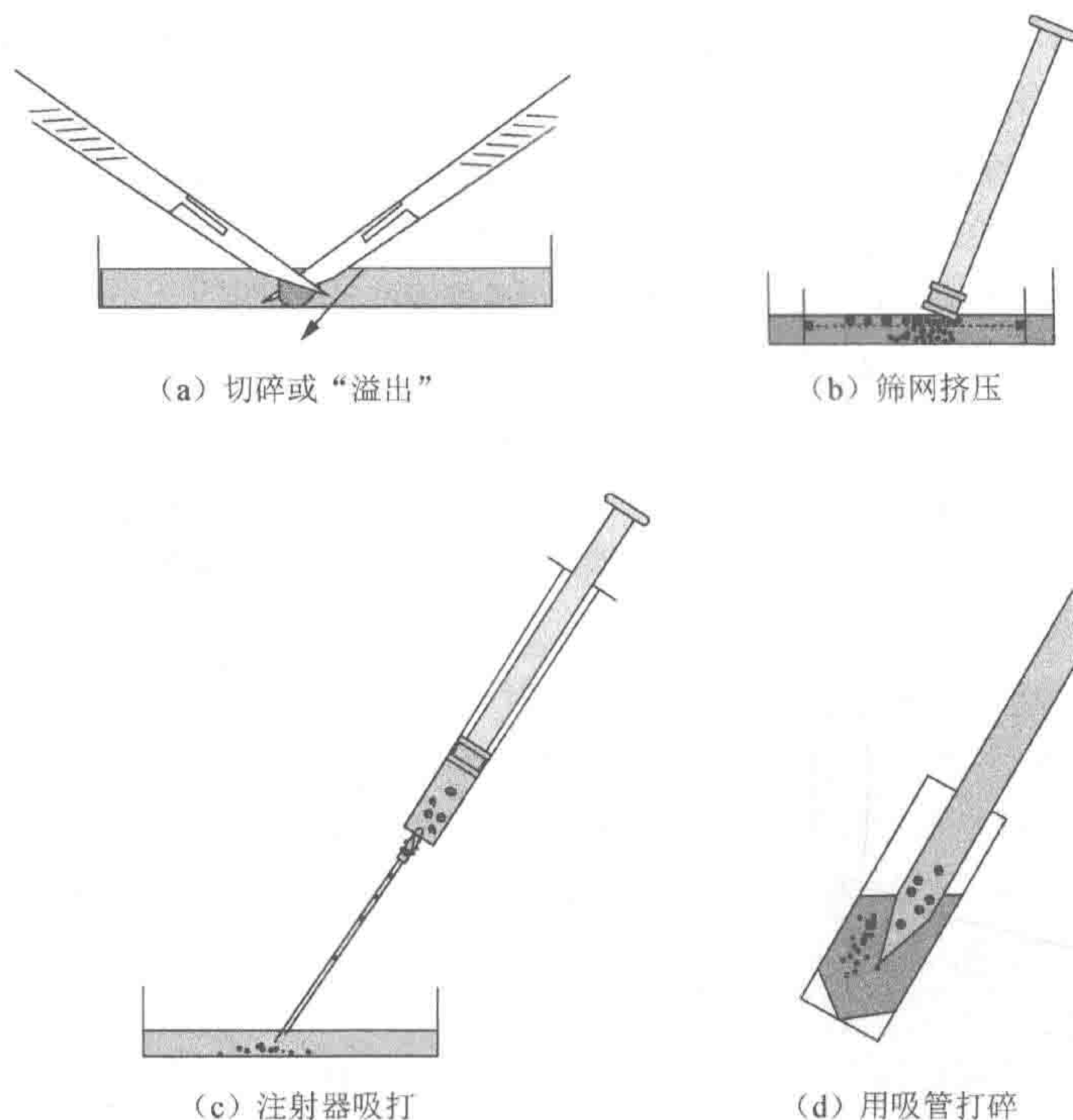


图 11.13 机械法解离。（a）切碎或“溢出”，切割作用或被切表面的破损使细胞释放出来；（b）筛网挤压，用注射器芯将组织挤压过筛网（可用 Falcon 细胞筛；见图 11.8）；（c）注射器吸打，将组织吸入注射器中，通过一个大孔径的针头或导管将液体快速打出；（d）用吸管打碎，用大孔径的吸管吸取组织块上下吹打

方案 11.10 利用筛网的机械分离法

概要

用力使培养基中的组织通过一系列筛孔尺寸逐渐减小的筛网，直到产生单细胞或小组织块的理想悬液，悬液可直接稀释并培养。

材料

无菌

- 生长培养基，如 DMEM/F12，含 10%胎牛血清，100mL

- 镊子，1对
- 筛网（图 11.13b）或孔径 20~100μm 的一系列筛网，或 Falcon 的细胞滤器（Corming；图 11.8），1套3个筛网
- 9cm Petri 培养皿，3个
- 离心管，50mL，2个
- 手术刀（11#刀片），2个
- 一次性塑料注射器（2mL 或 5mL），2个
- 培养瓶，6个

操作步骤

1. 清洗和初步切割组织后（参见方案 11.4 的步骤 1 和步骤 2），将组织切碎为 3~5mm^3 大小，每次取几块组织块放在孔径 1mm 的不锈钢或聚丙烯筛网上，网置于 9cm Petri 培养皿中（图 11.13b）或 50mL 离心管上（图 11.8）。
2. 用注射器的芯轻轻加压使组织通过网孔进入培养基，吸取培养基吹过筛网将细胞冲下。
3. 吸取分离的组织加入一个孔径更小的筛网，也许是 100μm 孔径，重复步骤 2。
4. 此时获得的细胞悬液可稀释接种，或者为了得到单细胞悬液，也可进一步通过 20μm 的筛网。通常对细胞悬液分散程度越高，剪切力越大，存活率越低。
5. 用培养基将细胞悬液稀释至 2×10^5 个/mL、1×10^6 个/mL 或 2×10^6 个/mL，接种于培养瓶。

适用于此方法的仅仅是较软的组织，如脾、胚肝、胚脑、成年脑或部分人和动物的软质肿瘤。对于脑，即使易于做到完全分解，然而与酶消化的结果相比，虽然花费的时间较少，但悬液中存活的细胞数也少。若组织取材不受限，细胞数量无关紧要，在短时间内机械法可产生与酶消化同样多的活细胞，但这种方法要消耗更多的组织。死细胞可通过离心而去除（参见 11.3.9 节）。

11.3.9 分离活细胞

当组织被分离并接种成为原代培养时，只有一定比例的细胞具有生存能力，形成原代培养物（参见 2.7 节）。有些细胞可能没有贴附能力，然而也可存活；另一些不能存活，坏死或凋亡。如何测定坏死或凋亡细胞的比例很重要，可采用生存力染色或流式细胞术的方法（参见 24.3.1 节、23.7 节）。通常情况下第一次更换培养基时死亡的细胞即可被清除。如果是悬浮状态生长的原代培养物，当细胞开始增殖后，死亡的细胞将逐渐被稀释而清除。必要时也可在分离得到的细胞悬液中加入 Ficoll 和甲泛影钠（sodium metrizoate）的混合物（如 Hypaque 或 Triosil）（Vries et al., 1973），通过离心将死亡细胞从原代培养物中去除。这种方法类似于从外周血中分离淋巴细胞的技术（参见方案 25.22-Su），活细胞位于培养基与 Ficoll/metrizoate 的交界面，死亡的细胞形成小团并沉降于试管底部。

方案 11.11 富集活细胞

概要

在25~50mL螺口盖离心管中加入6mL的Ficoll-Hypaque溶液，将9mL含2×10^7个细胞的培养基加在上面，离心，从交界部位收集活细胞。

材料

无菌

- 细胞悬液，细胞团尽量少，10~20mL
- 洁净的离心管或常规容器，2个
- Ficoll-Paque 溶液（GE Heathcare）或其他类似物（参见补充材料中的附录Ⅲ）（Ficoll/metrizoate，调至$1.077g/cm^3$），10~20mL
- 生长培养基，100mL
- 带有钝的插管或平针头的注射器，10mL，巴斯德吸管或移液器，1个

非无菌

- 细胞计数器，1个
- 离心机

操作步骤

1. 让悬液中大的组织团块沉降。
2. 把9mL的细胞悬液加在6mL的Ficoll泛酸溶液上面，此步骤应在广口、透明有盖的离心管中进行，如30mL Sterilin或Nunclon常规容器，或Corning 50mL透明的塑料管，容器体积应两倍于上述溶液的体积。
3. 将混合物离心，400*g*（在界面中间测量），15min。
4. 用巴斯德吸管或移液器小心吸去上层液体，勿破坏界面。
5. 用注射器或巴斯德吸管或移液器小心收集交界面液体。

▲安全提示 若使用人或其他灵长类的材料，不要用尖针头或玻璃巴斯德吸管。

6. 用培养基（如DMEM/F12，含10%胎牛血清）将混合液稀释至20mL。
7. 将混合液离心，70*g*，10min。
8. 去除上清液，用5mL生长培养基重悬细胞小团。
9. 重复步骤7和8清洗细胞，使之不含密度培养基。
10. 用血细胞计数板或电子计数仪计数细胞。
11. 接种至培养瓶中培养。

此过程可按比例扩大或缩小，可使密度培养基与细胞悬液以低比例混合（如 5mL 细胞悬液加入 1mL 密度培养基）。

11.3.10 原代培养小结

分离组织并进行原代培养，是特殊功能细胞培养的第一个也是最重要的阶段。若在这一阶段细胞丢失了，则是不可补救的。不同种类的细胞应采用相应的技术方法（另见第 25 章）。一般而言，胰蛋白酶比胶原酶作用强，有时建立单细胞悬液更有效。毫无疑问，胶原酶不能解离上皮细胞，但这一特性成为它的一个优点，可利用它使上皮细胞与间质细胞分离并保持上皮细胞团的活力。机械法比酶消化法快，但对细胞损伤大。最好的办法是分别试用上述技术（参见方案 12.4~方案 12.9），选择你们自己系统中最有效的方法。若均无效，可加量或用其他酶类（参见表 11.1），如链霉蛋白酶、裂解酶、Liberase、Accutase 和 DNA 酶，用不同的浓度测试或查阅文献。

11.3.11 原始记录

无论原代培养采用什么方法，重要的是对培养物来源和衍化做好记录，包括种系、性别、组织来源、相关病理、细胞分离和原代培养的过程（表 11.3）。若在好的实验室条件（GLP）下工作（参见 6.10 节），这种记录不仅是为了满足需要，而且是必需的。记录可保存于笔记本或其他有记录纸的硬壳文件夹中，但最好从此时开始在计算机数据库建立记录，此记录是保持细胞系起源的第一步。某个数据库的记录也许永远不会超出原代培养阶段，但从反面看，如果它变成一个有价值的细胞系，更应该在第一阶段建立准确的记录。若记录不再相关，可以永久删除，但不应在细胞系建成并表现一定重要性之后才做记录。负面的结果应该保留，可用于找出失败原因，也可用于将来统计成功率。

有必要在细胞系生命过程的晚期阶段确认其起源，尤其是怀疑有交叉感染的时候。所以在原代培养开始分离组织时应从同样的个体中保留组织、血或 DNA 样本，此样本可作为 DNA 绘谱的参照材料（参见 13.1.5 节、13.1.6 节）。但如果保留了捐赠者的组织或 DNA，需要获得伦理批准。

表 11.3 原代培养的数据记录

日期………………………… 时间……………………… 操作者……………………………………

		记录
组织来源	种类	
	种系	
	年龄	
	性别	
	途径或动物标记	
	组织	
	部位	
	储存组织/DNA 定位	

续表

		记录
病理	正常/良性/恶性	
	组织学	
分离试剂	胰蛋白酶、胶原酶等	
	浓度	
	作用时间	
	稀释液	
细胞计数	重悬后细胞浓度（C_1）	
	体积（V_1）	
	产量（$Y=C_1\times V_1$）	
	每克湿重组织的产量	
接种	数量（N）容器类型（瓶、皿或板）	
	终浓度（C_F）	
	每个瓶、皿或板的体积（V_F）	
培养基	类型	
	供应商和批号	
	血清类型和浓度	
	批号	
	其他添加物	
	CO_2浓度	
包被基质	如纤连蛋白、基质胶、胶原等	
传代培养	第一次传代的细胞存活数，细胞数/瓶	
	%（存活的细胞÷接种细胞数）	
	细胞系的名称	

参考文献

Anazawa T, Balamurugan AN, Bellin M, Zhang HJ, Matsumoto S, Yonekawa Y, Tanaka T, Loganathan G, Papas KK, Beilman GJ, Hering BJ, Sutherland DE (2009). Human islet isolation for autologous transplantation: comparison of yield and function using SERVA/Nordmark versus Roche enzymes. *Am. J. Transplant.* **9**:2383–2391.

Berry MN, Friend DS (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**:506–520.

Biological industries (www.bioind.com/page_13950).

Booth C, O'Shea JA (2002). Isolation and culture of intestinal epithelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 303–335.

Brieño-Enríquez MA, Robles P, García-Cruz R, Roig I, Cabero L, Martínez F, Garcia Caldés M (2010). A new culture technique that allows in vitro meiotic prophase development of fetal human oocytes. Hum. Reprod. **25**:74–84.

Carrel A (1912). On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* **15**:516−528.

Chen TC, Curthoys NP, Lagenaur CF, Puschett JB (1989). Characterization of primary cell cultures derived from rat renal proximal tubules. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **25**:714−722.

Cole RJ, Paul J (1966). The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **15**:245−260.

Compton CC, Warland G, Nakagawa H, Opitz OG, Rustgi AK (1998). Cellular characterization and successful transfection of serially subcultured normal human esophageal keratinocytes. *J. Cell Physiol.* **177**:274−281.

Directive 2010/63/EU (http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063, Annex IV).

Dobbs LG, Gonzalez RF (2002). Isolation and culture of pulmonary alveolar epithelial type II cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 278−301.

Elliget KA, Lechner JF (1992). Normal human bronchial epithelial cell cultures. In FreshneyRI (ed.), *Culture of epithelial cells*. New York, Wiley-Liss, pp. 181−196.

EMAP (Environmental Monitoring and Assessment Program), 2013 (www.emouseatlas.org/emap/home.html).

EU Directives (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (http://new.eur-lex.europa.eu).

Failli A, Consolini R, Legitimo A, Spisni R, Castagna M, Romanini A, Crimaldi G, Miccoli P (2009). The challenge of culturing human colorectal tumor cells: Establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches. *Tumori* **95**:343−347.

Finkelstein JN, Shapiro DL (1982). Isolation of type II alveolar epithelial cells using low protease concentrations. *Lung* **160**:85−98.

Freshney RI (1972). Tumour cells disaggregated in collagenase. *Lancet* **2**:488−489.

Freshney RI, Freshney MG (2002). In FreshneyRI (ed.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, Chapters 6, 10, 11, 12, 13.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward 4, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JR, Meredith J, Stacey GN1, Thraves P, Vias M; Cancer Research UK. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **111**:1021−1046.

Glavin GB, Szabo S, Johnson BR, Xing PL, Morales RE, Plebani M, Nagy L (1996). Isolated rat gastric mucosal cells: Optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**:1174–1179.

Grozdanov V1, Müller A, Sengottuvel V, Leibinger M, Fischer D (2010). A method for preparing primary retinal cell cultures for evaluating the neuroprotective and neuritogenic effect of factors on axotomized mature CNS neurons. *Curr. Protocols Neurosci.* Chapter 3, Unit 3.22 (Oct. 2010).

Harrison RG (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**:140−143.

Heald KA, Hail CA, Downing R (1991). Isolation of islets of Langerhans from the weanling pig. *Diabetes Res.* **17**:7−12.

HFEA (2013). *The Human Fertilisation and Embryology Authority Code of Practice*, 8th ed. (www.hfea.gov.uk).

HTA (2013). Human Tissue Authority (www.hta.gov.uk).

Inamatsu M, Matsuzaki T, Iwanari H, Yoshizato K (1998). Establishment of rat dermal papilla cell lines that sustain the potency to induce hair follicles from afollicular skin. *J. Invest. Dermatol.* **111**:767−775.

Lasfargues EY (1973). Human mammary tumors. In KruseP, PattersonMK (eds.), *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press, pp. 45−50.

Nicosia RF, Ottinetti A (1990). Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: A comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:119−128.

NRES (National Research Ethics Service) (2013) (www.nres.nhs.uk).

OHRP (Office for Human Research Protections) (2011) (www.hhs.gov/ohrp/).

OLAW (Office of Laboratory Animal Welfare) (2013) (http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm).

Pfragner R, Freshney RI (eds.) (2004). *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, Chapters 1, 2, 3, 5, 14.

Schaeffer WI (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:97−101.

Schaffer K, Herrmuth H, Mueller J, Coy DH, Wong HC, Walsh JH, Classen M, Schusdziarra V, Schepp W (1997). Bombesin-like peptides stimulate somatostatin release from rat fundic D cells in primary culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **273**:G686−G695.

Seglen PO (1975). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**:29−83.

Speirs V (2004). Primary culture of human mammary tumor cells. In PfragnerR, FreshneyRI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 205−219.

Stampfer MR, Yaswen P, Taylor-Papadimitriou J (2002). Culture of human mammary epithelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 95−135.

Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jerónimo C, Carvalho F, Bastos ML, de Pinho PG, Carvalho M (2011). A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS ONE* **6**(5):e19337.

Vries JE, Benthem M, Rumke P (1973). Separation of viable from nonviable tumor cells by flotation on a Ficoll-triosil mixture. *Transplantation* **5**:409−410.

Waymouth C (1974). To disaggregate or not to disaggregate: Injury and cell disaggregation, transient or permanent? *In Vitro* **10**:97−111.

Zaroff L, Sato GH, Mills SE (1961). Single-cell platings from freshly isolated mammalian tissue. *Exp. Cell Res.* **23**:565−575.

（陈实平 译）

第12章

传代培养和细胞系

一旦将原代培养物进行传代培养，培养物就变成了细胞系。有限细胞系经过一段固定的生命周期就会发生衰老，而连续细胞系是永生化的，可以进行无限传代培养（参见2.7.2~2.7.4节）。

12.1 术语定义

原代培养物是指从动物身上取得的初始培养的细胞。原代培养物一旦经次代培养（或传代），就称为细胞系了（Schaeffer，1990）。这一术语表明它包含具有相同或不同表型的几个细胞谱系。如果证明这一细胞群体当中的部分细胞具有某些特殊特性，用克隆培养（参见方案16.1）、物理细胞分离（参见第17章），或其他选择技术分离出这种细胞谱系，这样的细胞系称为细胞株（参见附录Ⅱ）。如果细胞系在体外发生了转化，将变成连续细胞系（参见2.7.4节、22.3节和22.4节），如果经选择或克隆并鉴定后则称为连续细胞株。

有时使用细胞系和细胞株代表不同的含义。细胞株代表从原代培养来的传代培养物，具有有限的生命周期（Hayflick and Moorhead，1961），而细胞系是指转化的或者连续细胞系。这两种不同的定义方式还存在争议，为了避免混淆，本书中我们使用上面的定义（Schaeffer，1990）。

12.2 传代培养和扩增

第一次传代培养体现了培养物的一次重要转变。需要传代培养，表明原代培养物已增殖，占据所有可利用的基质。因此，细胞已增殖是其重要特征。虽然原代培养物经第一次传代培养后生长分数有所变化（参见23.11.1节），并根据培养细胞的类型不同而不同，但传代培养生长分数通常较高（≥80%）。原代培养物极具异质性，即包含原组织中多种细胞类型，经过传代培养可产生相对均质的细胞系。这一过程除了生物学意义外，也具有非常重要的实用性，因为这时的培养物可进行扩增、鉴定和储存，同时细胞数量的潜在增长及细胞的均匀一致可供更大范围的潜在应用（参见表1.5）。目前有大量的细胞系可供使用（表12.1），其中大部分可以通过有信誉的细胞库获得（参见表15.5，15.5节，另见补充材料的附录Ⅲ）。

第一次传代培养后获得第二代培养物，之后是第三代培养物，依次类推。但在实际应用中，

表 12.1 常用细胞系

细胞系	形态学	起源	种属	年龄	染色体倍性	特征	参考文献
正常组织来源的有限细胞系							
IMR-90	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体	对人类病毒感染敏感；接触抑制	Nichols et al.，1977
MRC-5	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体	对人类病毒感染敏感；接触抑制	Jacobs，1970
MRC-9	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体	对人类病毒感染敏感；接触抑制	Jacobs，1979
WI-38	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体	对人类病毒感染敏感	Hayflick and Moorhead，1961
正常组织来源的连续细胞系							
3T3-A31	成纤维细胞		BALB/C 小鼠	胚胎期	非整倍体	接触抑制；易被转化	Aaronson and Todaro，1968
3T3-L1	成纤维细胞		Swiss 小鼠	胚胎期	非整倍体	脂肪分化	Green and Kehinde，1974
BEAS-2B	上皮细胞	肺	人	成年			Reddel et al.，1988
BHK-21-C13	成纤维细胞	肾	叙利亚仓鼠	新生	非整倍体	以多瘤病毒转化	Macpherson and Stoker，1962
BRL3A	上皮细胞	肝	大鼠	新生		产生 IGF-2	Coon，1968
C2	成纤维样细胞	骨骼肌	小鼠	胚胎期		肌管	Blau et al.，1983；Morgan et al.，1992
C7	上皮样细胞	下丘脑	小鼠			垂体后叶激素运载蛋白；后叶加压素	Devitry et al.，1974
CHO-K1	成纤维细胞	卵巢	中国仓鼠	成年	二倍体	染色体核型简单	Puck et al.，1958
COS-1，COS-7	上皮样细胞	肾	非洲绿猴	成年		DNA 转染的良好宿主	Gluzman，1981
CPAE	内皮细胞	肺动脉内皮	牛	成年	二倍体	第八因子，血管紧张肽II转化酶	Del Vecchio and Smith，1981
HaCaT	上皮细胞	角质细胞	人	成年	二倍体	角质化作用	Boukamp et al.，1988
HEK-293	上皮细胞	肾	人	胚胎期	非整倍体	易转染	Graham et al.，1977
L6	成纤维样细胞	骨骼肌	大鼠	胚胎期		肌管	Richler and Yaffe，1970
LLC-PKI	上皮细胞	肾	猪	成年	二倍体	Na^+-依赖的葡萄糖摄取	Hull et al.，1976
MDCK	上皮细胞	肾	狗	成年	二倍体	隆凸，转运	Gaush et al.，1966；Rindler et al.，1979
NRK49F	成纤维细胞	肾	大鼠	成年	非整倍体	TGF-α，β 诱导其悬浮生长	DeLarco and Todaro，1978
STO	成纤维细胞		小鼠	胚胎期	非整倍体	用作胚胎干细胞的饲养层	Bernstein，1975
Vero	成纤维细胞	肾	猴	成年	非整倍体	病毒基质及检测	Hopps et al.，1963
肿瘤组织来源的连续细胞系							
A2780	上皮细胞	卵巢	人	成年	非整倍体	化疗敏感，有耐药株	Tsuruo et al.，1986
A549	上皮细胞	肺	人	成年	非整倍体	合成表面活化剂	Giard et al.，1972
A9	成纤维细胞	皮下组织	小鼠	成年	非整倍体	$HGPRT^-$；来源于 L-929	Littlefield，1964b

续表

细胞系	形态学	起源	种属	年龄	染色体倍性	特征	参考文献
肿瘤组织来源的连续细胞系							
B16	成纤维样细胞	黑色素瘤	小鼠	成年	非整倍体	黑色素	Nilos and Makarski，1978
C1300	神经元	神经母细胞瘤	大鼠	成年	非整倍体	神经突	Lebermann and Sachs，1978
C6	成纤维样细胞	神经胶质瘤	大鼠	新生	非整倍体	神经胶质纤维酸性蛋白，GPDH	Benda et al.，1968
Caco-2	上皮细胞	结肠	人	成年	非整倍体	转运离子和氨基酸	Fogh，1977
EB-3	淋巴细胞	外周血	人	未成年	二倍体	EB 病毒+ve	Epstein and Barr，1964
Friend	悬浮	脾	小鼠	成年	非整倍体	血色素	Scher et al.，1971
GH1，GH2，GH3	上皮样细胞	垂体肿瘤	大鼠	成年		生长激素	Buonassisiet al.，1962；Yasumura et al.，1966
HeLa	上皮细胞	子宫颈	人	成年	非整倍体	G6PD TypeA	Gey et al.，1952
HeLa-S_3	上皮细胞	子宫颈	人	成年	非整倍体	贴瓶率高；可悬浮生长	Puck and Marcus，1955
HEP-G2	上皮样细胞	肝细胞瘤	人	成年	非整倍体	有某些微粒体代谢酶	Knowles et al.，1980
HL-60	悬浮	髓系白血病	人	成年	非整倍体	吞噬作用，新四唑蓝还原作用	Olsson and Ologsson，1981
HT-29	上皮细胞	结肠	人	成年	非整倍体	可用 NaBt 诱导分化	Fogh and Trempe，1975
K562	悬浮	髓系白血病	人	成年	非整倍体	血色素	Andersson et al.，1979a，1979b，1979c
L1210	淋巴细胞		小鼠	成年	非整倍体	生长迅速；悬浮生长	Moore et al.，1966
L-929	成纤维细胞		小鼠	成年	非整倍体	由 L 细胞克隆而来	Sanford et al.，1948
MCF-7	上皮细胞	乳腺癌胸膜渗出物	人	成年	非整倍体	雌激素受体+ve，隆起，α-乳白蛋白	Soule et al.，1973
MCF-10	上皮细胞	纤维囊性乳腺组织	人	成年	近二倍体	形成隆起	Soule et al.，1990
P388D1	淋巴细胞		小鼠	成年	非整倍体	悬浮生长	Dawe and Potter，1957；Koren et al.，1975
S180	成纤维细胞		小鼠	成年	非整倍体	肿瘤化疗筛选	Dunham and Stewart，1953；Abercrombie and Turner，1978
SK-HEP-1	内皮细胞	肝细胞癌，内皮	人	成年	非整倍体	第八因子	Heffelfinger et al.，1992
U251 MG	神经胶质细胞	胶质母细胞瘤	人	成年	非整倍体	GFAP	Ponten and Macintyre，1968
WEHI-3BD+	悬浮	骨髓	小鼠	成年	非整倍体	产生 IL-3	Nicola，1987
ZR-75-1	上皮细胞	乳腺癌腹水	人	成年	非整倍体	ER-ve，EGFr+ve	Engel et al.，1978

这种命名方式很少用于第二代以上的培养物。在 Hayflick 及其他人利用二倍体成纤维细胞的研究中（Hayflick and Moorhead，1961），每次传代培养都将原培养物分成两半再培养（传代比率为 1∶2），所以培养物传代数（passage number）与细胞代数（generation number）一致。然而，它们不必一致。传代数是培养物经过的传代培养次数，而细胞代数是培养过程中细胞群体经过的倍增次数，原代培养物的倍增次数是近似数。例如，在 Hayflick 实验中，当传代比率为 1∶2 时，传代数与细胞代数大致相同。鉴于细胞代数主要代表了培养物的年龄，因此如果以大于 1∶2 的传代比率传代培养，基于细胞群体倍增次数的细胞代数就比细胞传代数增加的快了（参见 12.5.3 节和图 12.4）。这两种估算都未考虑坏死、凋亡、分化、早衰及退出周期而导致的细胞丢失。这些情况在每次传代间的生长周期中都会发生。

12.2.1 交叉污染和鉴定错误

但是，细胞系的培养会出现很多不想要的结果。增殖和冻存延长了培养物的寿命及可用性，同时也增加了交叉污染的风险（参见第 13 章）。当一个实验室培养不止一种细胞时，经常会出现一种细胞被意外地混入另一种细胞的情况，如果混入的细胞生长速度更快，它将过度生长并最终取代原来的细胞。这种污染可能的原因有移液不当、细胞间共用培养基和吸管、同时打开了不止一种细胞的培养瓶或培养基所产生的气雾。另外，交叉污染的原因还有传代培养和冻存时贴错标签、接种在错的培养瓶或者冰箱中管理不当导致细胞系被错误认定。这导致了多达 470 个细胞系被交叉污染（参见表 13.1，另见 ICLAC）。在引进或使用一个新的细胞系开始工作的时候，尤其是自己新建了一种细胞系时，对细胞进行身份认证非常必要。你需要检查这个细胞系不是 ICLAC 数据库中交叉污染的细胞，并且它的 DNA 图谱和这个细胞已知的图谱相同。若没有已知的 DNA 图谱，提示这个细胞系是特有的，并且没有交叉污染。如果你确信这个细胞的身份真实，应该把这个 STR 图谱上传到 NCBI 生物样品数据库，并取一部分细胞样品送到权威的细胞库（ATCC、ECACC、DSMZ、JCRB 和澳大利亚细胞库，见表 15.5），他们会确认这个细胞的身份、有没有生物污染。

为了降低交叉污染的风险并避免引起严重的结果，保持好的细胞培养的程序（参见第 5、13 章）非常重要。

12.2.2 支原体污染

增殖细胞系，尤其是连续细胞系的第二大常见问题是隐匿的污染，经常是支原体污染（McGarrity，1976）。原代培养和早代数细胞的感染通常导致培养物的迅速降解及死亡，但是连续细胞对感染有一定的耐受，常常不易被察觉。感染物的主要来源是操作者、其他感染的细胞和组织、天然物质如血清和胰蛋白酶。虽然改进的消毒程序降低了来自天然物质的感染，但是操作者、引进的细胞和其他物质仍存在严重的问题（参见 18.3.2 节）。建立一个支原体检测体系绝对必要，以确保：①增殖的细胞没有污染；②任何新引入实验室的物质（组织、细胞系、生物制品）不会带来污染（参见方案 14.1、方案 14.2）。为了避免偶然引入感染的细胞系，应该从有声誉的细胞库获得细胞。

如果不能实现，那么这些细胞至少要经过两种方法（参见第 14 章）检测并证明没有支原体感染后才能使用。不管在实验室操作多么仔细，都不能省却常规检查，一旦大范围污染，带来的损失远远超过常规检查的花费。

12.2.3 细胞系的命名

命名细胞系时使用字符过少会造成困扰，例如，EJ-1 可以是一个膀胱癌细胞系（实际是 T24），可以是一个大 B 细胞淋巴瘤细胞系（Goh et al.，2003），也可以是肺炎链球菌的一个噬菌体（Goh et al.，2007）。T406 是一种人口腔鳞癌细胞系（Zhao et al.，2011），但是也被用来代表一种胶质瘤细胞系（Malter et al.，1987）。细胞命名中还存在其他一些问题，如 3T3 原本是指细胞传代方案（3×10^5个细胞/$5cm^2$的 Petri 皿，每 3 天传代），而并不是细胞实际的名字。这就导致了一些细胞系名字中均含有 3T3，如常用细胞 3T3、3T3-Swiss、NIH/3T3 和 BALB/3T3，就是按照这种传代培养的方式而被命名的。由它们来源的亚克隆株的命名，在这些有用的细胞株的名字上增加了它们的独特性，如 3T3-L1 和 BALB/3T3-A31。因此细胞系命名应该是唯一的，并鉴定它的 DNA 指纹。细胞库通过给每一个细胞一个接受号来解决这一问题，当使用的是来自细胞库的细胞时，应该在材料和方法的部分给出这个接受号。

新细胞系应有一个独特的代号或名称并且不限于细胞名称（ICLAC；Yu et al.，2015）。避免使用容易与基因、微生物、表位或者其他缩写混淆的名称。开始培养前，从收到活检组织或标本就建立日志或计算机数据库文件进行记录非常有用。在这种情况下，日志或数据库文件中的记录号也许与识别字符代号相关联，可用来为细胞系命名。例如，LT156 即是肺肿瘤活检标本 156 号。这种方法很少产生同一字母代号用于两种不同的细胞系这样的混乱情况，并可以自动参照细胞和组织的接受记录，根据保密规则，提供者首字缩写不用于细胞命名。发表文章或作报告引用细胞系时，将来源实验室的代号以前缀形式加在原细胞系名称前很有帮助（如 WI 来自于 Wistar Institute，NCI 来自于 National Cancer Institute，SK 来自于 Sloan-Kettering）（Federoff，1975）。在文章的材料和方法部分第一次提到一种细胞系时，应给出它的全称，以后部分可直接用其缩写形式。亚系或者克隆可以通过一个连字符加上一个数字或者字母数字混合的后缀。当从数据库中搜索细胞系时，标点可能造成麻烦，所以命名细胞系时不要使用空格、星号、上标、下标、斜线、问号或其他标记，并保持连贯。

小结：

（1）不要使用提供者的名字或者首字缩写。

（2）选择一个至少有 6 个字母长的名字（亚系和克隆可以延长）。

（3）不要使用在计算机搜索中可能带来混淆的字符，如斜线、问号或者星号。

（4）在 PubMed 中搜索来确保命名唯一，使用空格或者连接符进行不同的尝试，如 T406、T 406、T-406，以及全称或部分名称，如 NCI-H420 和 H420。

（5）保持命名方式的一贯性，在材料方法部分首次提到时引用全称。

12.2.4 培养物的年龄

培养寿命有限的细胞系被称为有限细胞系，它表现出很好的再生状态（参见 2.7.2 节）。它们增

殖代数有限，通常经过20~80次细胞倍增而发生衰老（参见2.7.3节、22.3.1节和短篇综述22.1）。细胞倍增的确切次数由宿主种属、不同的细胞谱系、克隆变异和培养条件所决定。但在相同条件下，同一细胞系细胞的倍增数是稳定一致的。因此，在引用一个细胞系时注明它自体外培养起大致的代数或倍增数目是很重要的，这里用了“大致”一词是因为在原代培养中经历的代数很难估计。

12.2.5 有限细胞系和连续细胞系

对于有限细胞系，应估计群体倍增代数并在上斜线后表明，例如，NHB2/2以1∶2传代一次，细胞代数加1（NHB2/2、NHB2/3等），以1∶4传代则细胞代数加2（NHB2/2、NHB2/4等），依此类推。这只是标记和记录中使用得方便的方式，并不涉及细胞系的命名（所以斜线是可以使用的）。当培养连续细胞系时，通常将自上次复苏后的传代次数用p表示，标注在细胞名后，如HeLa-S_3/p4。连续细胞系已经脱离了衰老控制（参见表12.1），所以细胞代数变得不太重要，从而经常用最近一次复苏后的传代次数来代替。另外，由于细胞增殖率和饱和密度的提高（参见22.4节），传代比例增大（1∶100~1∶20）且重要性降低，而传代时的细胞密度变得更关键（参见12.5.3节）。

使用连续细胞系（表12.2）有很多优点，如生长速度快、能够达到的最大密度高、贴瓶效率增加、一些连续细胞系可以悬浮生长、血清依赖性下降。但同时也有一些缺点，连续细胞系在遗传上不稳定、具有异质性、容易失去正常形态，并且可能具有致瘤性。

表12.2 有限及连续细胞系的特性

特性	有限	连续（转化）
倍性	整倍性，二倍体	非整倍体，异倍体
转化	正常	永生化，生长控制改变，成瘤性
停泊依赖性	是	否
接触抑制	是	否
细胞增殖密度限制	是	减弱或丧失
生长方式	单层	单层或悬浮
维持	周期性	可能呈稳定状态
血清需求	高	低
克隆形成率	低	高
标记	组织特异的	染色体的、酶的、抗原的标记
特异功能（如病毒易感性、分化）	可能保留	常丢失
生长速率	慢（T_D为24~96h）	快（T_D为12~24h）
产量	低	高
控制参数	代数，组织特异标记	株特征

12.3 选择细胞系

在选择细胞系时，除了特殊的功能要求外，还应考虑一些通用参数。

（1）有限细胞系与连续细胞系。有表达所需功能的连续细胞系吗？连续细胞系一般更容易培

养，生长更快，更容易克隆培养，而且每瓶细胞产量更高，更适合无血清培养（表 12.2）。

（2）正常细胞与转化细胞。细胞系是否恶性转化重要吗？如果重要，那么应该用没有致瘤性的永生化细胞系，如 3T3-Swiss 细胞或 BHK-21-C13。

（3）种属。种属重要吗？非人类细胞系有较少的生物危害限制性，而且具有来源组织更容易得到的优点。

（4）生长特征。在生长速率、产量、贴瓶率及易收集等方面有什么要求？需考虑以下参数：

（a）群体倍增时间（参见 23.9.3 节、23.9.7 节）。

（b）饱和密度——每培养瓶细胞产量（参见 23.9.3 节、23.9.7 节）。

（c）贴壁效率（参见 23.10 节）。

（d）生长分数（参见 23.11.1 节）。

（e）悬浮生长的能力（参见 22.4.1 节，表 12.5）。

（5）可用性。如果必须用有限细胞系，那么有足量储备可供利用吗？或者必须自己建系？如果选择连续细胞系，那么有已鉴定的细胞系可供利用吗（参见第 6 条及附录Ⅲ，补充材料中的细胞库）。

（6）准确性。若细胞系已存在，那么它的特征是否已很好地鉴定（参见 6.10.3 节）？如果没有，那么自己能否做必要的特征鉴定（参见 18 章）？该细胞系可靠吗（参见 13.1.1 节）？细胞间的交叉污染已有很多报道（参见表 12.2 和 ICLAC），用一个细胞系开展工作前排除交叉污染至关重要。

（7）表型表达。该系能用来表达所需的特性吗（参见 19.7 节）？

（8）对照细胞系。如果你用突变的、转染的、转化的或其他非正常细胞系，是否有与之对应的正常细胞系作对照？这样的对照是否必需？


彩版 7

（9）稳定性。该细胞系稳定性如何（参见 22.2 节和彩版 7）?是否经过克隆培养？如果没有，你能进行克隆吗？这种克隆培养过程要产生足量冻存的及可用的细胞需要多长时间？

12.4 常规培养

无论是原代培养还是细胞系的传代培养，一旦培养开始，就要定期更换培养基或“饲喂或补充活力”，如果细胞增殖，随后迟早要进行传代培养。对于不增殖的培养物，也需要定期更换培养基，因为细胞仍会消耗营养并分泌产物，培养基的某些成分会耗尽或自然降解，pH 会改变。更换培养基和细胞传代间隔在不同细胞系中因生长速率和新陈代谢的不同而不同。快速生长的转化细胞系，如 HeLa 细胞系，通常每周传代一次，4 天后换液。生长缓慢的细胞系，特别是非转化的细胞系，可能每 2 周、3 周，甚至 4 周传代一次，两次传代之间每周换液（参见 12.4.2 节）。

12.4.1 细胞形态的意义

无论进行哪种实验操作，仔细观察培养物以确定无污染至关重要（表 12.3，另见 14.3.1 节，图 14.2）。还应检查细胞异常情况，如核周颗粒、胞质空泡，以及细胞隆起变圆与基质分离（图

12.1)。这些迹象提示细胞需要换液，或者更严重的问题，如培养基或血清不足或有毒性、微生物污染或细胞系衰老（参见28.1节）。BEAS-2B应该在无血清的条件下培养，添加血清会引起变性。培养基不足可启动细胞凋亡（见2.3.1节、24.1节，彩版17c、d）。在常规培养过程中，换液或传代的频率要避免这样变性，因为这些变化很难逆转。


彩版17

表12.3　常规培养中细胞的检查

状态	标准	提示操作
外观	形态	与相同密度的记录照片对比确认
	密度	与这一培养阶段期望的密度进行对比
		如果偏高或者偏低，改变接种浓度
	有丝分裂	表明增殖，无需操作。若不存在，检查生长条件
	恶化	检查是否污染（参见14.3节）
		检查生长条件，如有必要进行改正
		丢弃，从液氮或冰箱中重新复苏
	改变、转化、异质（混合细胞的证据）	丢弃，从冻存管中重新复苏
		与记录照片比对
		检查身份认证和可靠性（参见13.1.4节）
	污染	丢弃培养物和它使用的培养基和试剂（参见14.4节）
		若重复或大范围污染，鉴定和消除源头（参见14.5.4节）
维持	细胞密度/浓度	偏高，传代；合适（50%~70%汇合），检查pH，如有需要换液
	培养基pH	偏低，根据细胞密度/浓度换液或传代
		偏高，检查培养瓶是否泄露、CO_2孵箱的浓度、是否污染
		若所有培养物都高，检查培养基的制备

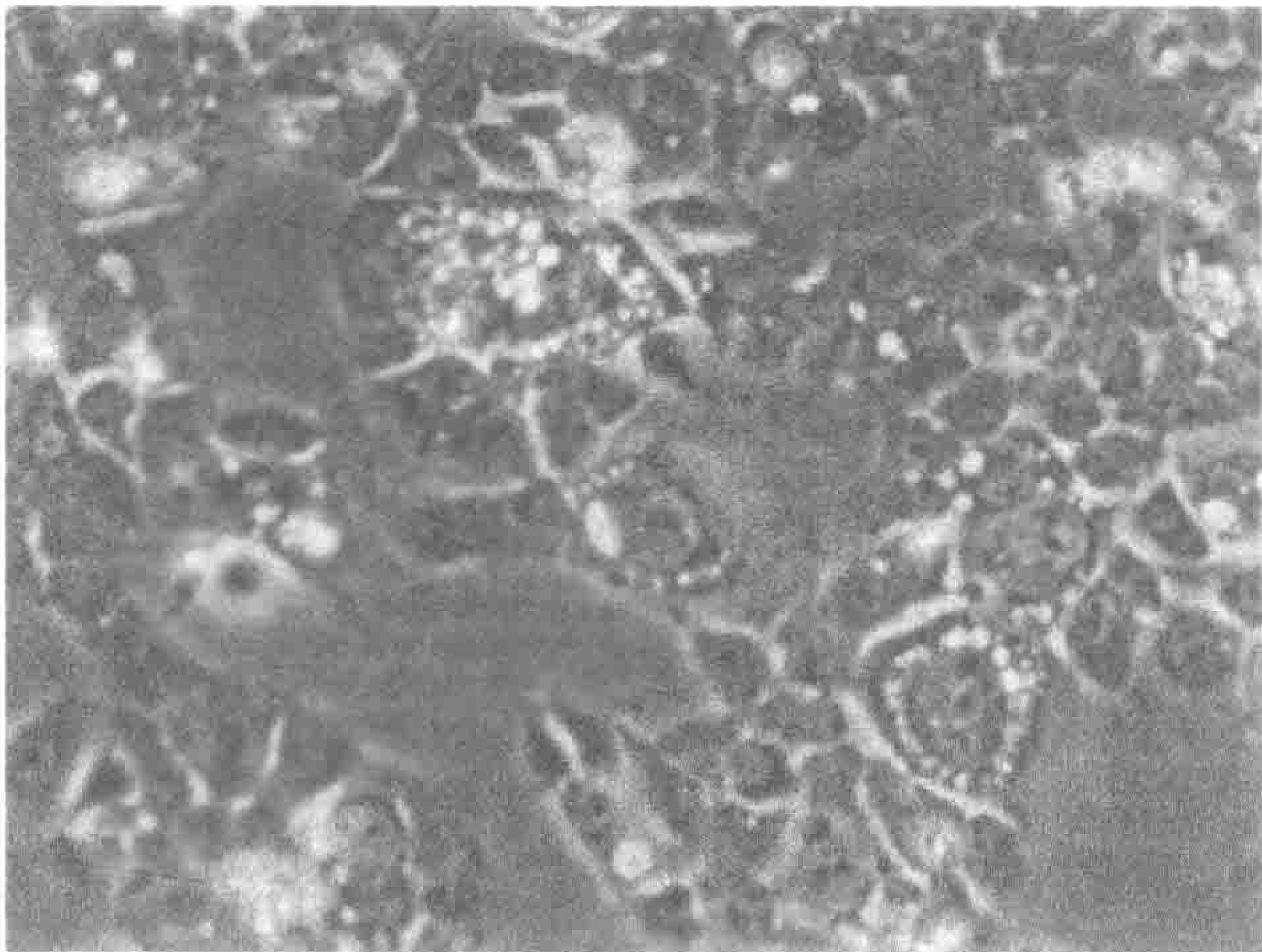


图12.1　不健康细胞。支气管上皮细胞（BEAS-2B）由于培养基不足而空泡化及颗粒化。细胞质特别是细胞核周围形成颗粒及空泡。若细胞伸展性受损，细胞边缘折光性增加


彩版9


彩版10


彩版27


彩版28

熟悉细胞形态，可发现细胞交叉污染或错认细胞的最早迹象。备一套在不同密度（特指细胞密度，即每平方厘米的细胞计数）拍摄的各种细胞的图片供日常处理细胞时参考很有用（参见图18.2和彩版9、彩版10、彩版27、彩版28)，特别是有新的工作人员开始细胞培养时。细胞培养观察的方法在第27章提供（参见27.3节练习7）。

12.4.2 培养基的更换

有4个指标表示需要更换培养基。


彩版22

（1）pH降低。要考虑pH降低的速率和确切值。当pH从7.0降至6.5，大多数细胞停止生长；在pH 6.5，细胞开始失去活性。如果培养基从红色变成橙色，再变成黄色，那么需要更换培养基（彩版22b）。尽量估计pH降低的速率。如果pH为7.0的培养物每天降低0.1 pH单位，那么在换液前多放置一两天没什么伤害；但若培养物每天降低0.4 pH单位，则需在24~48h换液，不可不换液而放置过周末。

（2）细胞浓度。细胞以高浓度培养比以低浓度培养更快地消耗培养基。pH变化速率能够证明这一点，但也不总是如此。

（3）细胞类型。正常细胞（如二倍体成纤维细胞）通常在高密度时停止分裂（参见22.4.2节），这一现象是由于细胞聚集、形状改变、生长因子耗尽及其他一些因素造成的。这些细胞停滞在细胞周期的G_1期，即使放置2~3周甚至更长时间，细胞也很少变性。然而，转化细胞、连续细胞系及一些胚胎细胞在细胞密度过高时迅速变性，除非每天换液或传代。

（4）形态衰退。这点需通过定期观察和熟悉细胞系来预计（参见12.4.1节）。如果任其退化发展下去，它将成为不可逆的，细胞将会进入凋亡（参见2.3.1节、24.1节）。

体积、深度和表面积 通常培养基的体积与表面积比是0.2∶0.5（mL/cm^2）（另见23.9.4节）。其上限由通过液体层的气体扩散所决定，而最适比例由该细胞的需氧量决定，需氧量高的细胞在较浅的培养基中生长较好（如2mm），而需氧量较低的细胞在较深的培养基中生长较好（如5mm）。如果培养基的深度大于5mm，气体扩散会受到限制。对于单层培养物，这一问题可通过摇晃培养瓶（参见21.1.4节、21.2.2节），或以培养基灌注培养物并在中间储存器中进行气体交换来解决（参见20.3.2节、21.2.5节）。搅动培养基可以提高培养基深度达到5cm的悬浮培养细胞含氧量，之后有必要使培养基分散开来（参见21.1.4节）。

维持培养基 更换培养液时，即使细胞密度很高，也常伴随细胞有丝分裂的激活。不需要激活有丝分裂时可使用维持培养基。维持培养基是常规培养基将血清浓度降至0.5%或2%，或完全去除血清，或无血清培养并去除生长因子。这种操作可以使大多数非转化细胞停止有丝分裂。转化细胞系不适宜做这种处理，它们会继续生长或者可能变性，因为转化细胞不会被调控在细胞周期的G_1期停滞（参见2.3.1节）。

维持培养基可维持有限细胞系处于一种非增殖的状态，以免耗尽它们有限的细胞倍增代数（参见2.7.3节）。降低血清细胞分裂停止率，也可促进某些细胞分化表型的表达（Maltese and Volpe，1979；Schousboe et al.，1979）。用于活检标本收集的培养基也可以称为维持培养基，在本书中用收集培养基来表示（参见附录Ⅰ）。

12.4.3 标准的换液方案

换液包括去除旧培养基和更换新鲜培养基（方案12.1）。本方案也可以在练习9中使用，使用的培养基可通过练习8来制备（参见27.3节）。

方案 12.1 培养瓶中单层培养细胞更换培养液

概要

以肉眼和倒置显微镜观察培养物，若有指征（如 pH 降低），去除旧培养基加入新鲜培养基，再重新放入温箱培养。

材料

无菌或无菌制备

- 培养的细胞
- 生长培养液
- 移液管，各种刻度，塞上棉花，按照 1mL、5mL、10mL、25mL，分类装在方形吸管盒中（如果是玻璃的，在吸管盒中灭菌；单个包装的塑料移液管，为了方便和无菌，也可以放在吸管盒中）
- 不塞棉花的吸除培养液的吸管（如果要用真空泵或真空管线）

非无菌

- 吸液器或洗耳球（参见图 4.2 和图 5.7）
- 连接废液瓶与真空管线的管子，或连接废液瓶与蠕动泵的管子（参见图 4.9）
- 装了 70%乙醇的喷壶
- 无短绒的拭子或抹布
- 吸水纸巾
- 带水和消毒剂的吸管桶（参见图 4.1，6.8.6 节）
- 防乙醇的记号笔
- 笔记本、笔、操作步骤等

操作步骤

1. 确认干净，并以 70%乙醇擦拭，准备好超净工作台。
2. 实验所需的试剂及材料、瓶子以 70%乙醇擦拭，立即放进超净工作台（参见方案 5.1）。
3. 仔细观察培养物是否有污染或衰退迹象（参见图 12.1 和图 14.2）。
4. 检查前述更换培养基的标准——pH 和细胞密度或浓度，以你对于该培养物行为的了解决定是否更换培养液，若需换液，则继续进行下面的操作。
5. 将培养物放于无菌工作区域。
6. 打开盖。
7. 取无菌吸管，插上洗耳球或吸液器，或选择与真空管线或泵连接的不塞棉花的吸管。
8. 倾斜培养瓶，弃旧培养基，倒入废液缸或通过抽吸的管线吸除培养液。
9. 弃吸管。
10. 打开培养液瓶盖。
11. 取新吸管，加入同体积的新鲜培养基。如果要确保细胞的生长没有间断，将培养基预热至 37℃

是非常重要的，盖好瓶盖。

12. 弃吸管。

13. 盖好培养瓶和培养液的瓶盖。

注意事项 若需要在 5%的 CO_2 条件下培养，在 CO_2 的培养箱中使用具有透膜瓶盖的培养瓶，或者将培养瓶置于 5%的 CO_2 中 10s 后重新拧好盖子，放入普通的孵箱或温室。

14. 将培养物重新放回孵箱（CO_2 或其他合适的）。

15. 在记录单、实验记录本或平板电脑上，完成观察及换液记录。

16. 清走所有吸管、玻璃品、其他可移动物品，擦拭工作面。

当培养物密度低或生长缓慢时，最好进行半量换液——在第 8 步只吸除一半旧培养基，在第 11 步补入相同体积的新鲜培养基。

在给 Petri 皿或者多孔板进行换液时要格外小心，因为它们盖子下的整个细胞面在操作过程中均会暴露出来，所以更容易污染。

12.5 传　　代



彩版 4

当细胞密度（细胞数/cm^2 基质）达到铺满整个瓶底有效基质时，或者当细胞浓度（细胞数/mL 培养基）超出培养基的能力时，细胞生长停止或者生长速度大大减慢（参见图 18.2b、d、f、h、j、l，彩版 4d）。这时需要分瓶、传代或者转移，传代后一般是以较低的密度和浓度继续培养。细胞传代后到下一次传代的生长过程通常遵循一种标准的方式（图 12.2）。接种后先经过一段延迟期；然后进入指数生长期，称为对数期；再进入平台期，此时增殖停止（正常细胞）或者增殖

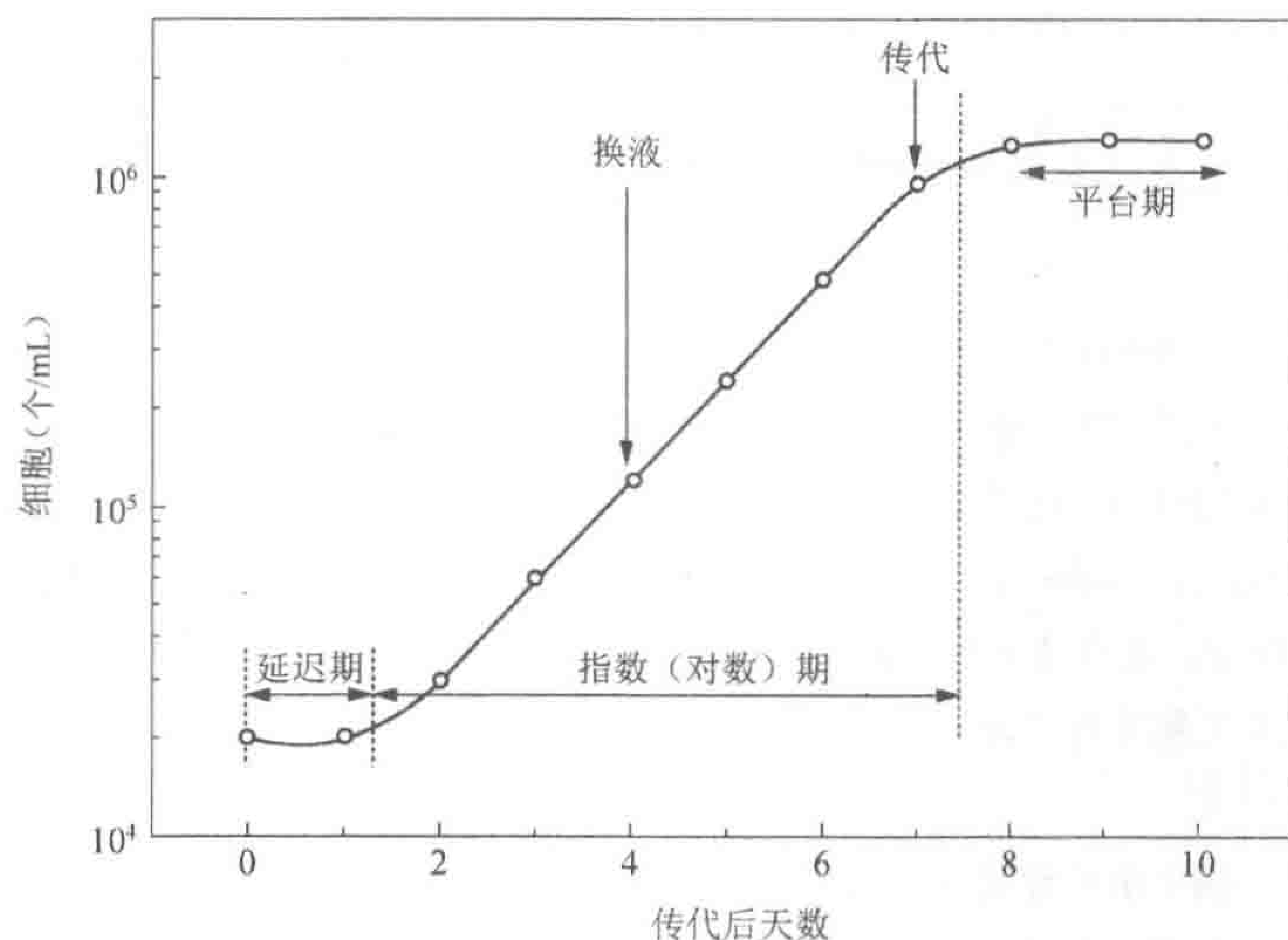


图 12.2 生长曲线和维持。细胞浓度对传代时间的半对数曲线，显示了延迟期、指数生长期和平台期，指出了传代和换液的时间（另见 23.9.2 节，图 23.8）

的细胞等同于丢失的细胞（通常为转化细胞）。细胞应该在进入平台期之前的对数期进行传代，这样可以提高接种效率（传代后贴壁生长的细胞数）并缩短延迟期。

对于贴壁细胞系，也就是单层生长的细胞，传代通常包括去除旧培养基，用胰蛋白酶消化单层细胞（参见 12.5.5 节悬浮培养细胞的传代）；一些贴壁能力弱的细胞（如 HeLa-S_3），可通过摇晃培养瓶，收集培养液中的细胞，以新鲜培养基稀释并以适当浓度重新接种于新培养瓶中。细胞与细胞之间及细胞与基质之间的黏附由细胞表面的糖蛋白和 Ca^{2+}介导（参见 2.2.1 节）。来源于细胞和血清的其他蛋白及蛋白聚糖与细胞表面和基质表面结合促进细胞黏附。细胞传代通常需要螯合 Ca^{2+}并降解细胞外基质，还可能要降解一些细胞黏附分子的胞外区域。所以经常把蛋白酶如胰蛋白酶与 EDTA 合用来结合二价阳离子。确保同期使用的胰蛋白酶活性相同，因为不同批次胰酶活性可能不同，要达到相同的活性可能需要不同的浓度（参见 11.1.1 节和附录 I ）。

某些单层细胞不能用胰蛋白酶消化，而需要另外蛋白酶的作用，如链霉蛋白酶、离散酶和胶原酶（表 12.4，另见表 11.1）。在这些蛋白酶中，链霉蛋白酶最有效，但它对某些细胞有毒性。离散酶和胶原酶一般比胰蛋白酶的毒性要弱，但可能不能使上皮细胞完全分散。其他蛋白酶，如 Accutase、Accumax（脊椎蛋白酶）、Liberase、SplitKit（植物蛋白酶）、Trypzean 和 TrypLE（重组胰蛋白酶）也有供应，当标准的消化程序有问题时或是需避免哺乳类（如猪胰蛋白酶）或细菌（如链霉蛋白酶）蛋白酶时，应测试这些蛋白酶的功效。处理的强度取决于细胞的类型和细胞对蛋白酶解的敏感性。应选择那些既能产生高活性单细胞悬液毒性又低的方法。

胰蛋白酶能够发挥最佳蛋白酶解活性的 pH 在 7.8~8.5，对培养细胞来说，这个 pH 太高了。但是，权衡最大酶活性和最小细胞损伤，还是应该选择碱性的 pH，通常为 7.6 左右。对细胞做一次预冲洗可以去除残留的培养基，并且使 pH 维持在 7.4 左右，再加入胰蛋白酶后可以使其在碱性条件下充分发挥作用，但若是高酸性的培养物则需要格外注意。

12.5.1 传代标准

依据以下标准判断单层细胞是否需要传代。

（1）*细胞密度*。正常细胞长至彼此汇合时，就需要传代了。若继续放置超过 24h，细胞将脱离细胞周期，再接种培养需要很长时间恢复。转化细胞达到汇合或汇合后短时间内也需传代，尽管它们在达到汇合后可继续增殖，但经过二次倍增后它们将开始衰退，而且再接种效率降低。一些上皮细胞系，如 Caco-2，在汇合后很难消化，所以它们在达到汇合前就需要传代。

（2）*培养基耗尽*。培养基的耗尽（参见 12.4.2 节）通常表明需要更换培养基，但是如果 pH 降得过快以致需要频繁地更换培养基，这时也许细胞就需要传代了。一般情况下，pH 的降低伴随着细胞密度的增加，这是需要传代的主要指标。

（3）*距上次传代的时间*。常规传代最好依据严格的时间表进行，这样可以保持和监控细胞的增殖行为。若到了适合的时间细胞还没有达到足够高的密度（即细胞没有彼此汇合），那么应增加接种密度；相反，若细胞很快彼此汇合，那么应降低接种密度。最好通过绘制生长曲线决定正确的接种密度和传代间隔（参见 12.5.3 节、23.9.2 节）。一旦这一常规程序建立起来，对于一定的接种密度，培养时间和细胞产量每次周期性生长是一致的。偏离这一模式意味着细胞偏离正常

生长条件或表明细胞已衰退。理想的细胞浓度是使细胞4天换液，7天传代。

表 12.4 细胞解离程序

程序	预处理	解离试剂	培养基	应用范围
摇离	无	轻轻机械摇动，晃动或用力吹打	培养用液	有丝分裂或其他松散贴壁的细胞
擦离	无	细胞刮（如 Falcon 公司）	培养用液	应避免使用蛋白酶的细胞（如受体或表面蛋白分析）；可损伤细胞和很难获得单细胞悬液
单独胰蛋白酶[a]	彻底移除培养基	粗胰蛋白酶，0.01%~0.5%，通常为 0.25%	D-PBSA，CMF	大多数连续细胞系
预洗+胰蛋白酶	D-PBSA	粗胰蛋白酶，0.25%	D-PBSA	贴壁牢固的连续细胞和许多传代早期细胞
冷胰蛋白酶	D-PBSA，4℃	胰蛋白酶，粗制，0.25%，4℃	D-PBSA，CMF	敏感细胞
EDTA 预洗+胰蛋白酶	1mmol/L EDTA D-PBSA 配制	粗胰蛋白酶，0.25%	D-PBSA	贴壁牢固的传代早期细胞
预洗+胰蛋白酶/EDTA	1mmol/L EDTA D-PBSA 配制	粗胰蛋白酶，0.25%	D-PBSA+1mmol/L EDTA	许多上皮细胞，但有些对 EDTA、EGTA 敏感，可用 5mmol/L
纯化的胰蛋白酶	D-PBSA	纯化的胰蛋白酶，10~25μg/mL，4℃	D-PBSA	无血清的成纤维细胞（McKeehan，1977）
TrypLE	预洗或不预洗	提供 10×或 1×溶液，不提供浓度和具体活性，按说明	D-PBSA	常规传代
TrypZEAN	预洗或不预洗	提供 10×或 1×溶液，不提供浓度和具体活性，按说明	D-PBSA	常规传代
胰蛋白酶+胶原酶	1mmol/L EDTA D-PBSA 配制	粗胰蛋白酶，0.25%；粗胶原酶，200U/mL	D-PBSA+1mmol/L EDTA	致密和多层培养物，特别是成纤维细胞
离散蛋白酶	无	离散蛋白酶，0.1~1.0mg/mL	培养用液	上皮成片脱离（不打散上皮）
Accutase	D-PBSA	未提供活性，按说明	公司提供	不同的细胞（BD 公司）
木瓜蛋白酶	无	20U/mL	EBSS 加 1mmol/L 半胱氨酸和 0.5mmol/L EDTA	神经祖细胞和少突胶质细胞（Young and Levison，1997）（BrainBits 公司）
链霉蛋白酶	无	链霉蛋白酶，0.1~1.0mg/mL	培养用液	提供分散良好的单细胞悬液，但对某些细胞有毒性

a 不同纯度的消化酶均有供应（参见补充材料中的附录III）。粗提物包含其他蛋白酶，在解离某些细胞时可能有帮助，但对另一些细胞可能有毒性。从粗提物开始，如需要再用更纯的，纯度越高（U/g），其特异活性越高，所需浓度越低（μg/mL）。像血清一样进行批量检测和储存，对某些实验是必要的

（4）其他程序的要求。除常规扩增外，若有其他细胞需要时，也要进行传代；或为增加保存量；或为变换培养瓶或培养基类型。这些事最好选在细胞定期传代时进行，这样就可以知道培养是常规进行的、再接种条件是什么样的、有什么样的预期结果。然而，对细胞的要求并不总是与已建立的培养惯例相一致，这时需要一个折中方法。当细胞还处于延迟期时不可传代，应取尚未达到平台期且正处于指数生长中期的细胞（除非有特殊要求需要平台期细胞，在这种情况下，细胞需要频繁换液或连续灌注）。

处理不同细胞系 不同细胞系应分开处理，分开使用培养液和试剂。如果同时处理，特别是生长迅速的细胞，如HeLa，与生长较慢的细胞同时培养时，交叉污染的可能性很大（参见13.1.2节）。

标记 在培养瓶和其他培养器皿加入细胞前就做好标记可以预防混淆细胞。标记应该做在培养瓶的侧壁上，这样不会影响显微镜观察的视野；培养皿或多孔培养板应标记在底板的侧面（以免盖子和板子的分离造成混淆）。

彩版7

彩版8

彩版9

彩版10

彩版11

彩版12

12.5.2 单层生长细胞典型的传代方案

利用机械或者酶消化的方法（可加或不加螯合剂，如EDTA）可以分离单层细胞进而进行传代。方案12.2描述了单层细胞的胰蛋白酶消化过程（图12.3，彩版7~彩版12），EDTA预洗去除残留培养液、二价阳离子和血清（如果使用过）。依据细胞种类不同（表12.4），可不经预洗或仅用D-PBSA预洗，也可根据需要使用含有1mmol/L EDTA的胰酶来进行该程序。

方案12.2 培养板或培养皿中单层培养细胞更换培养液

概要

同方案12.1，另外基于培养容器的特点要特别注意避免污染。

材料

同方案12.1

操作步骤

去掉培养基等

1. 确认干净，并以70%乙醇擦拭，准备好超净工作台。
2. 实验所需的试剂及材料、瓶子以70%乙醇擦拭，立即放进超净工作台（参见方案5.1）。
3. 如果培养皿或者培养板是用保护盒封住的（参见图5.11），小心擦拭盒子的外侧，并保证不要倾斜培养皿或板。
4. 仔细观察培养物是否有污染或衰退迹象（参见图12.1和图14.2）。
5. 检查前述更换培养基的标准——pH和细胞密度或浓度，以你对于该培养物行为的了解决定是否更换培养液，若需换液，则继续进行下面的操作。
6. 将培养物放于无菌工作区域。
7. 将培养皿或培养板叠放在工作区的一边。
8. 如果要使用抽吸泵，打开它的开关。
9. 取不塞棉花的吸管插进抽吸管线，若不用抽吸泵，取一个塞了棉花的吸管，并把它插进移液器。
10. 取最上层的一个培养皿或培养板放在工作区的中心。
11. 移开盖子放置在皿的后边，从一边打开。

12. 尽可能拿培养皿底部的下端，注意不要碰到培养皿的边缘，也不要把手放在打开的培养皿或者盖子的上方。

注意事项 经过练习后，可以不用将盖子完全打开，只打开一部分，倾斜培养皿移除培养基，这样更快、更安全。

13. 倾斜培养皿，弃掉培养基。如果没有抽吸泵，将培养基通过漏斗倒进废液缸（见图5.8）。
14. 盖上盖子。
15. 将培养皿放在和未操作过的叠放的培养皿相对的工作区的另一边。
16. 剩余的培养皿或培养板重复以上操作。
17. 弃吸管，关掉泵的开关。

加培养基或细胞等

18. 将需要的培养基瓶放置好，松开瓶盖。
19. 将培养皿放在工作区的中心。
20. 打开培养基的瓶盖，用吸管吸入液体。
21. 拿开培养皿盖子，放在皿的后边。
22. 往培养皿中添加培养基，轻轻地直接加到培养皿底部的一边。
23. 盖好盖子（同样，经过练习后，可以不用完全打开盖子，只将盖子抬起，与移除培养基类似加入培养基）。
24. 弃吸管。
25. 把培养皿放在开始堆放培养皿的一边，注意不要让培养基进入培养皿的上缘与盖子之间的空隙中。
26. 第二个培养皿重复以上操作，依此类推。

注意事项 如使用的是大容量的吸管，并且每个培养皿或培养板需要加液多次，可以若干个皿或板共用一个吸管。但是已经给培养皿或板添加培养基后的吸管不能再放回装培养基的瓶中，以避免把细胞带入培养基中。

27. 将培养皿放回 CO_2 孵箱。

如果向一个已有细胞的培养瓶、培养皿或培养板中添加培养基，那么这次使用的这瓶培养基就成为这个细胞专用的，不再用于其他细胞。

方案12.3可根据需要调整（参见27.3节练习13）。

方案 12.3 单层细胞传代

概要

去除培养基，清洗单层细胞。加入胰蛋白酶短暂孵育，移走胰蛋白酶。以培养基分散细胞，计数，稀释并再接种。下面以1个75cm^{2}培养瓶中的A549细胞分到4个75cm^{2}培养瓶为例。

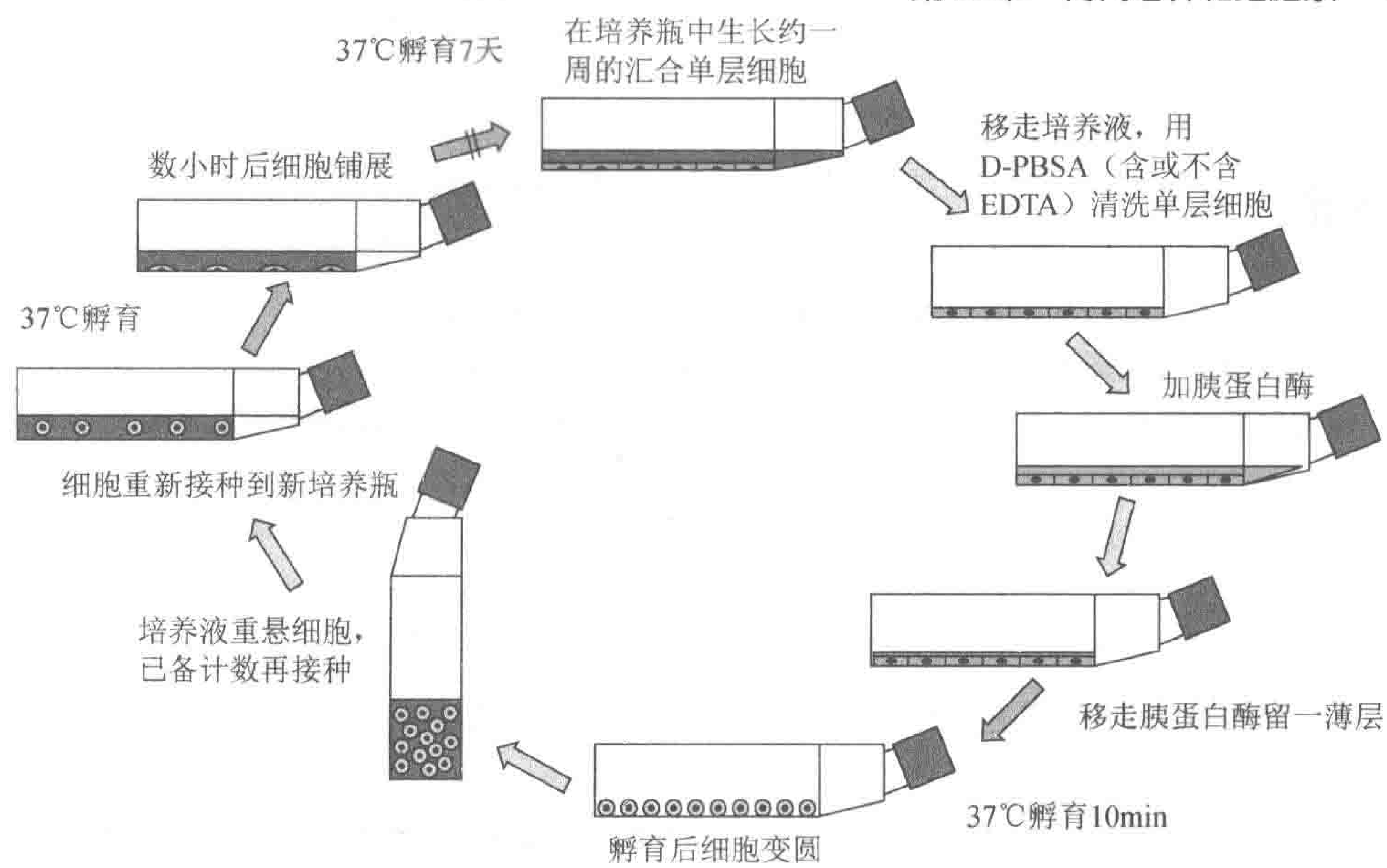






图 12.3　单层细胞传代。胰蛋白酶作用后单层细胞传代和生长周期的各阶段（另见彩版 4、彩版 5）

材料

无菌

- $75cm^2$ 培养瓶中对数生长期晚期的单层细胞（刚达到汇合）　1
- 生长培养基，含 Eagle's 盐的 Eagle's MEM　200mL
- 胰蛋白酶，0.25%，D-PBSA 配制（表 12.4），4℃放置　20mL
- D-PBSA 含 1mmol/L EDTA　20mL
- 移液管，各种刻度，塞上棉花，按照 1mL、5mL、10mL、25mL 分类装在方形吸管盒中，同方案 12.1
- 用于吸除培养液的未塞棉花吸管，如果使用泵和真空吸引管道
- 通用容器或 50mL 离心管　2
- $75cm^2$ 培养瓶　4

非无菌

- 移液器或洗耳球（参见图 4.2 和图 5.7）
- 连接真空吸引管道或蠕动泵的废液缸或管子（参见图 4.9 和图 5.8）
- 70%乙醇喷壶
- 无短绒拭子和抹布
- 吸水纸巾
- 带水和消毒剂的吸管桶（参见图 4.1）
- 防乙醇记号笔

- 笔记本或平板电脑、笔、操作步骤
- 血细胞计数板或电子细胞计数仪

操作步骤

1. 准备超净工作台，将试剂及材料置于超净台（参见5.4节）。

2. 仔细检查培养物有无污染或衰退迹象（参见图12.1和图14.2）。

3. 依据标准（参见12.5.1节）和你对该培养物行为的了解，决定是否需要传代；若需要传代，如下进行。

4. 将培养物置于无菌工作区域。

5. 打开瓶盖。

6. 取无菌吸管，插上洗耳球或吸液器，或选择与真空管或泵连接的不塞棉花的吸管。

7. 倾斜培养瓶，弃旧培养基，倒入废液缸或通过抽吸的管吸除培养液。

8. 弃吸管。

9. 为避免冲散细胞，沿培养瓶细胞面对侧加入15mL D-PBSA/EDTA（$0.2mL/cm^2$）清洗细胞，用滴管沿细胞对侧面吸去预洗液。这一步骤的目的在于去除可抑制胰蛋白酶作用的残留血清，并去除细胞黏附所需的二价阳离子。

10. 沿培养瓶细胞对侧面加入7.5mL 胰蛋白酶（$0.1mL/cm^2$）。翻转培养瓶平放，轻晃培养瓶确保胰蛋白酶完全覆盖细胞层。静置15~30s（如果使用的是室温的胰酶，缩短静置时间）。


彩版8

11. 轻轻倾斜培养瓶，使胰蛋白酶离开细胞层，快速检查，单层细胞应尚未脱落。如果细胞未解离就脱壁，可以使用4℃胰蛋白酶防止其发生。


彩版9

12. 吸走大部分胰蛋白酶，只留数滴。

13. 培养瓶于37℃平置孵育10min，直至细胞变圆隆起（参见图12.3和图23.4，彩版8~彩版11），倾斜培养瓶，单层细胞就会从培养瓶表面滑落（根据不同的细胞类型和生长周期的不同阶段，需要在37℃孵育5~15min）。注意不要消化时间过长，另外也不要在细胞消化好前强制将细胞吹打下来，这样将导致细胞聚团。


彩版10

注意事项 *在每种情况下，主要的解离试剂，不论是胰蛋白酶还是EDTA，仅做短暂停留，去除大部分消化液后，仅留少量消化液进行孵育。如果在分离细胞及后续制备单细胞悬液过程中遇到困难，可采用其他程序（表12.4）。*


彩版11

14. 加入10mL 培养液（$0.1 \sim 0.2mL/cm^2$），反复以吸管吹打细胞面以分散细胞。

15. 最后，将吸管的尖端放于培养瓶底角，上下吹打细胞几次，注意不要产生气泡。充分上下吹打以分散细胞使之处于单细胞悬浮状态。

注意事项 *吹打的强度各个细胞系有所不同，有的细胞系很容易分散，而有的则需大力吹打才能分散。但若吹打力量过大，几乎所有的细胞都会受到剪切力的机械损伤。原代或早期几代培养的细胞由于较脆弱和体积较大而尤其容易受到损伤，而连续细胞系通常有较大弹性，需要大力吹打才能完全解离。*

传代过程中单细胞悬液是较理想的，它有助于保证细胞的计数准确和再接种后均匀生长。若要进行细胞增殖或贴瓶率的计数或进行细胞克隆分离，制备单细胞悬液是必需的。

16. 用血细胞计数板或电子细胞计数仪计数细胞（参见23.1节）并记录数值。

17. 稀释悬液至合适的接种浓度:

加入适量细胞悬液到已有已知体积培养液的培养瓶中。

（a）稀释细胞悬液至较低浓度，需要的体积可按下式计算：

需要的浓度÷起始浓度×需要的体积

例如，需要将浓度2.36×10^6个/mL的细胞悬液，稀释为2×10^4个/mL的20mL，所需体积如下计算：

$$\frac{2\times10^4}{2.36\times10^6}\times20=0.17\text{（mL）}$$

即在每个培养瓶中加入0.17mL稀释到20mL。

（b）把细胞稀释至所需要的总体积，然后分到若干瓶中：

需要的浓度÷起始浓度×需要的体积

例如，需要将浓度2.36×10^6个/mL的细胞悬液，稀释为2×10^4个/mL的100mL，所需体积如下计算：

$$\frac{2\times10^4}{2.36\times10^6}\times100=0.85\text{（mL）}$$

即将0.85mL稀释到100mL。程序（a）适合常规传代，使用烧瓶不多且不需要准确的细胞计数和增殖能力测定，但若同时做多个相同的培养，程序（b）则更适合。因为操作的次数减少，每瓶中细胞密度完全一致。

18. 在$75cm^2$培养瓶上标记细胞名称、日期和你名字的首字母。

19. 接种4个$75cm^2$培养瓶：

每个瓶中加入19.15mL培养基，然后加入0.17mL消化后的细胞悬液。

或者，将0.85mL的细胞悬液稀释至100mL，混匀，每个$75cm^2$培养瓶中加入20mL。

如果细胞是在5% CO_2的普通孵箱或温室下培养，则从提前混合好的混合气体瓶或气体混合装置通过过滤管向培养瓶内培养基上面注入所需的5% CO_2（参见图5.12）。不要将气体吹入培养基内，那样会产生气泡，气泡可能使培养基的某些成分变质，同时也会增加污染的概率。或者使用具有膜透气性的瓶盖，在CO_2孵箱中培养。如果使用含Hank's盐的Eagle培养基，正常气相是空气，不需或需极少通气，即可以将培养瓶密封。

20. 盖上培养瓶，放回孵箱中。

因为塑料培养瓶内空气的膨胀会引起较大的培养瓶膨胀而不能平放，所以应在培养瓶放入孵箱30min后快速拧松瓶盖以减轻压力；或者，可以在盖紧培养瓶前通过挤压培养瓶的顶部和底部来应付这一问题（注意不要用力太大，将培养瓶压裂）。孵育后随气体膨胀可恢复正常的形状；或者，如果是要5% CO_2培养，使用膜透性的瓶盖可以避免这个问题。

12.5.3 生长周期和传代比率

常规传代使细胞重复标准生长周期（图12.4a，另见图12.2，方案12.4）。熟悉培养的每种细胞的这个周期是必需的，因为它决定着接种密度、传代前生长持续时间（传代间隔）、实验持续时间及获得最佳稳定性的采样的适合时间。处于生长周期不同时相的细胞在增殖能力、酶活力、糖酵解和呼吸作用、特殊产物的合成及其他许多方面表现均有所不同（参见23.9.2节、20.1.1节）。

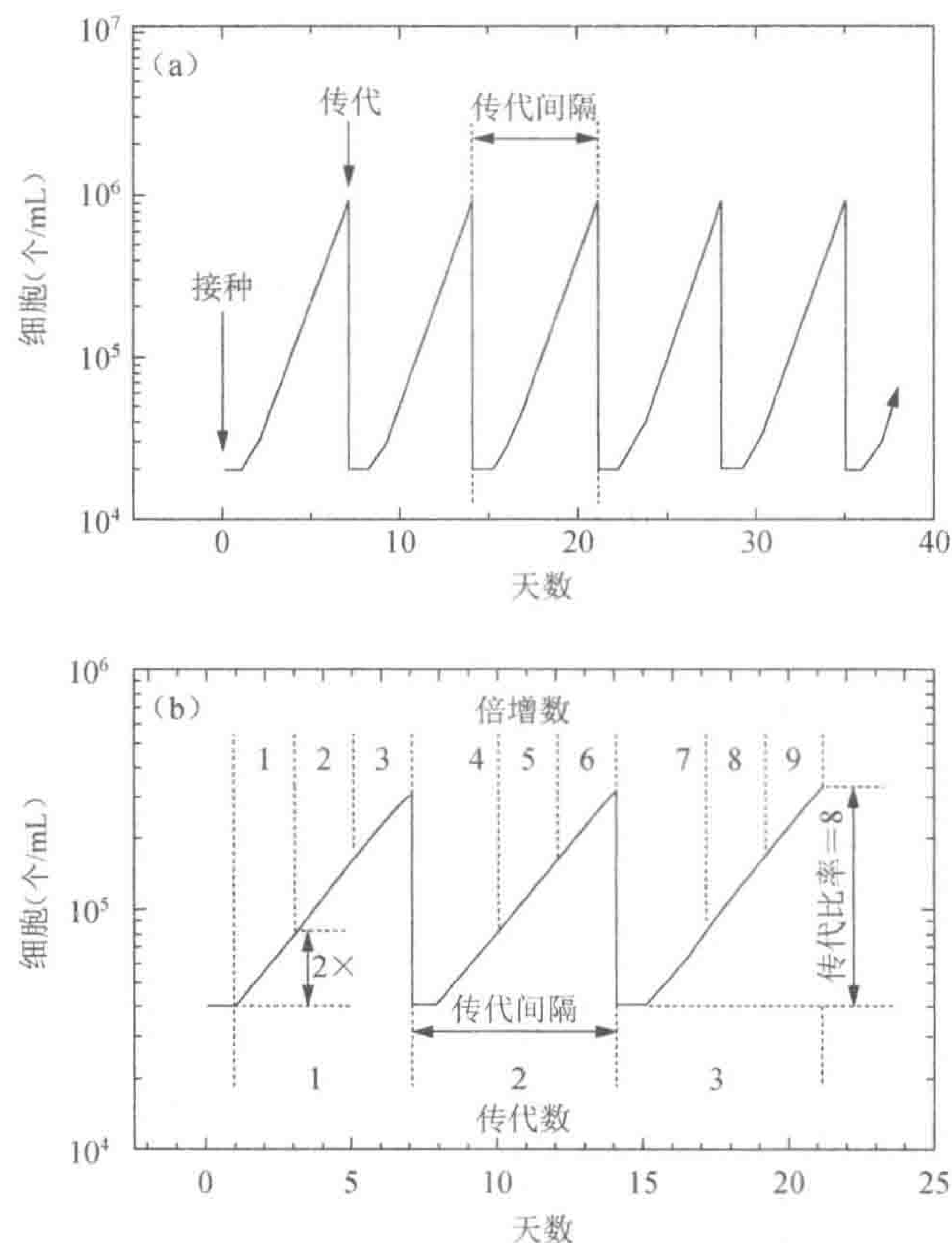


图 12.4 连续传代。（a）细胞扩增过程中重复标准生长周期：若细胞生长正常，并且接种浓度和传代间隔保持不变，则在每一周期的同一时间细胞应该达到相同的浓度（峰）。（b）倍增数和传代数：每次传代培养代表传代一次，但倍增数（本例传代一次是3代）依赖于传代比率（每次传代1∶8，对应3次倍增）

方案 12.4 新细胞的生长周期检测

概要

按照不同的细胞浓度接种12块12孔板，每天消化收集一块培养板中的细胞，计数每个孔中的细胞数。

材料

无菌或无菌准备

- 单层培养的待检测细胞，对数生长期晚期 — 1个 $75cm^2$ 培养瓶
- 胰蛋白酶，0.25%，粗制 — 100mL
- 生长培养基，含26mmol/L的 $NaHCO_3$ — 500mL
- D-PBSA（预洗和细胞计数用） — 500mL
- 12孔板 — 12个

非无菌

- 装培养板的塑料盒或者托盘
- CO_2 孵箱或者提供 5% CO_2 的净化箱

操作步骤

1. 按照常规传代步骤消化细胞（参见方案 12.3）。

2. 将细胞悬液分别稀释至 1×10^4 个/mL、2×10^4 个/mL、5×10^4 个/mL 和 1×10^5 个/mL 于 30mL 培养基中。

3. 用 1mL 细胞悬液铺 12 块 12 孔板 [图 12.5]：

第 1 列 3 个孔的细胞浓度为 1×10^4 个/ mL

第 2 列 3 个孔的细胞浓度为 2×10^4 个/mL

第 3 列 3 个孔的细胞浓度为 5×10^4 个/mL

第 4 列 3 个孔的细胞浓度为 1×10^5 个/mL

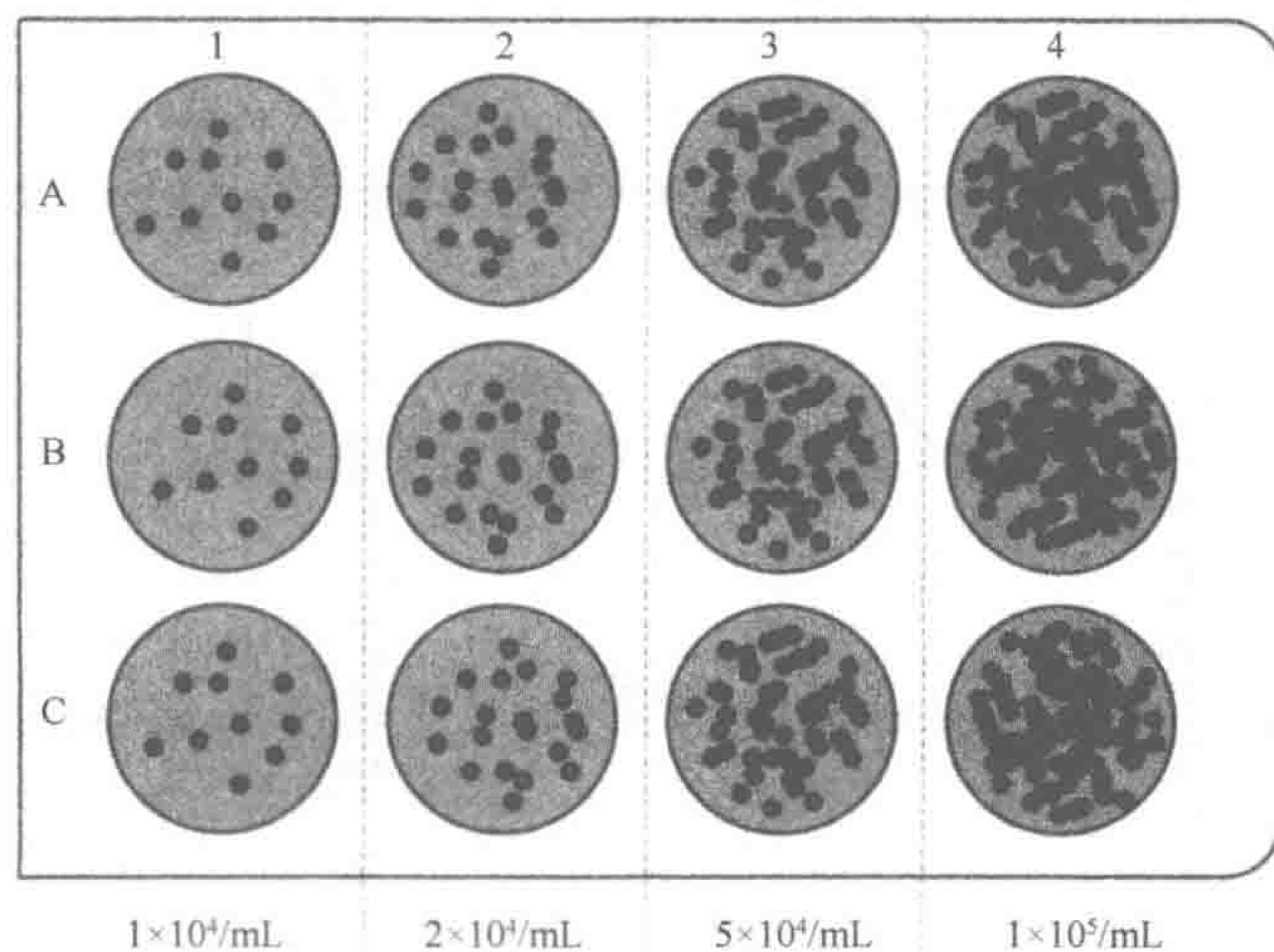


图 12.5 不同细胞浓度的生长周期。取 12 孔板，每列按照不同细胞浓度铺板，培养后每天进行细胞计数，共计 10 天。另取两块培养板进行染色

4. 将培养板放于湿化的 CO_2 孵箱中。

5. 24h 后，从孵箱中取出第一块培养板，分别计数每种浓度的 3 个孔中的细胞数。

6. 把每个孔中的培养基完全移除。

7. 每孔中加入 0.5mL 胰蛋白酶/EDTA。

8. 孵育培养板 15min。

9. 每孔中加入 0.5mL 含有 10%血清的对照培养基，将细胞分散在胰蛋白酶/EDTA/培养基中。

10. 按说明使用电子细胞计数仪检测悬液中的细胞数。

注意事项 也可以使用血细胞计数板来计数细胞，但是在细胞浓度低时使用起来比较困难。若要使用血细胞计数板，减少胰蛋白酶的体积至 0.1mL，用移液器小心地将细胞分散在胰蛋白酶中，避免气泡。

把细胞转移至血细胞计数板，数足够多的方框使计数超过200个细胞（参见方案20.1）。细胞计数乘以10得到细胞数/mL。

11. 每天重复步骤5，持续10天。

12. 第3天和第6天更换培养基（见方案12.2，彩版22b）。

13. 分别在第5天和第10天取1块培养板进行Giemsa染色（参见18.4.2节）。

14. 计算每孔的细胞数（同消化重悬后每毫升的细胞数），根据每毫升细胞数（细胞浓度）和培养天数绘制半对数图（另见23.9.2节）。因为每孔的面积是$3cm^2$，细胞数除以3得到是每平方厘米细胞数（细胞密度），它也可以和培养的时间一起来做图。

15. 从图中得出延迟期、倍增时间和细胞终浓度（参见图12.2、23.9.3节）。

彩版22

分析方案12.4得到的生长曲线可以帮助你选择正确的接种浓度，使细胞有最短的延迟期，常规的培养时间后可以达到最大细胞产量，并提醒你在细胞进入平台期前进行传代。一旦建立了传代的常规程序，连续传代会形成一个好的生长周期。即便不是每次传代时都检测，但在每个周期开始时按照同一浓度接种，将会具有相同的细胞产量。传代间隔应该是一致的（图12.6a）。

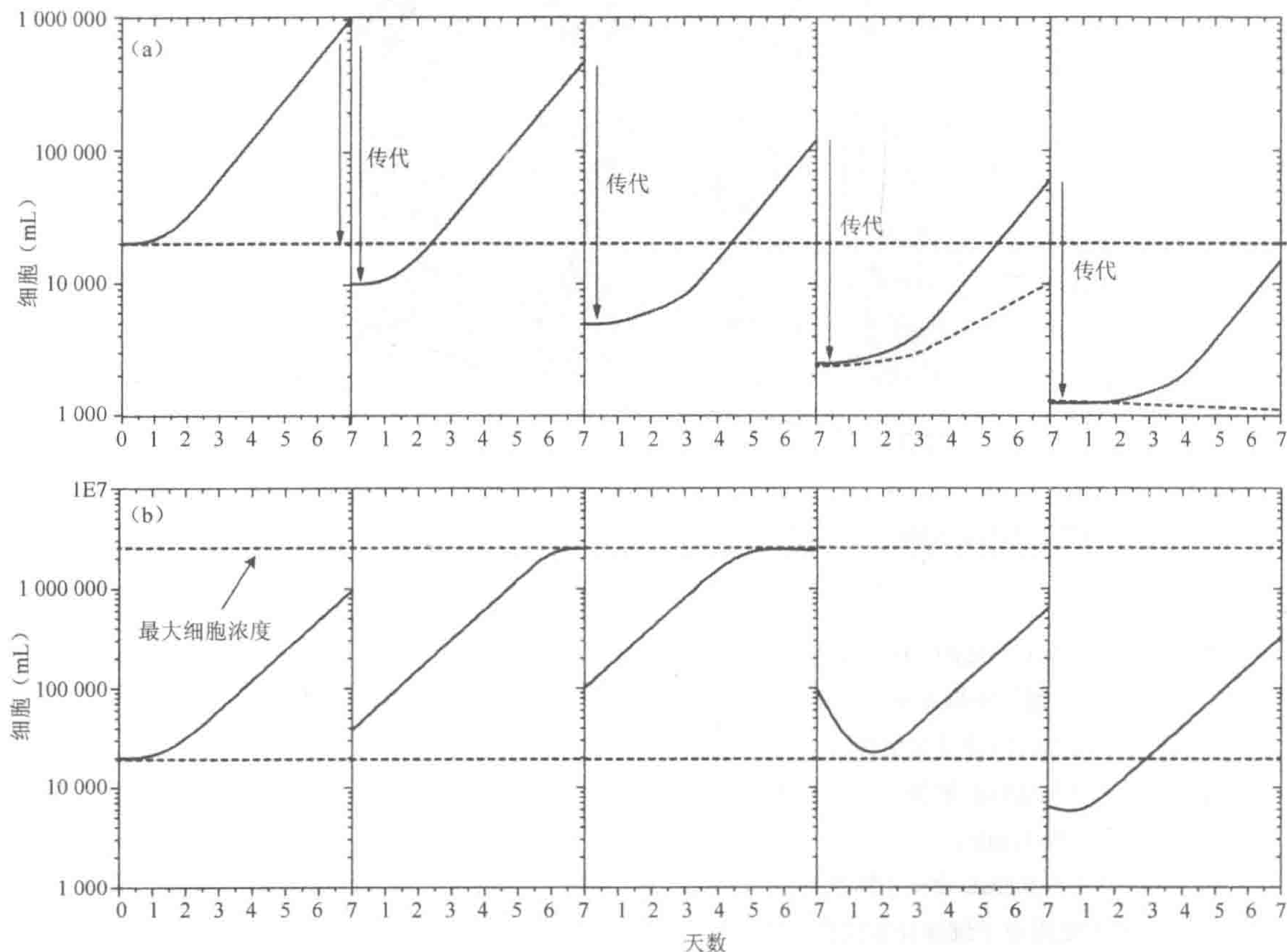


图12.6 传代比率错误。细胞在传代时必须按照正确的浓度进行接种。(a)细胞连续稀释浓度过大，会导致细胞产量下降并最终死亡；(b)若传代前细胞生长过密，会导致接种浓度过高，提前进入平台期并发生变性。实线表示没有细胞损失的产量，虚线表示传代前高浓度常导致凋亡和细胞损失

对于有限细胞系，传代时以 2 倍、4 倍、8 倍或 16 倍（传代比率分别是 2、4、8 和 16）降低细胞密度，计算群体倍增数更容易（即分别是传代比率 2 对应 1 次倍增、4 对应 2 次倍增、8 对应 3 次倍增、16 对应 4 次倍增）；例如，1 传 8 的培养物需要 3 次倍增才能达到原来相同的细胞密度（图 12.6b）。脆弱的或生长缓慢的细胞系通常 1 传 2，而有活力的、生长快速的细胞系可以 1 传 8，甚至 1 传 16。有些连续细胞系可 1 传 50 或 1 传 100。一旦细胞系变为连续细胞系（通常经过 150 或 200 倍增以上），细胞浓度是主要参数，培养浓度应降至 10^4~10^5 个/mL。可依据建立合适的传代间隔选择传代比率或稀释度，如传代间隔为 1 周或 2 周，则要保证稀释的细胞密度不可过低，应使其在合理延迟期（≤24h）后可重新进入生长周期，并且在下次传代前不进入平台期。

每次传代培养使细胞传代数+1（图 12.6b），但根据每次传代细胞倍增数不同，细胞代数（培养过程中细胞群体总的倍增数）不止增加 1。例如，细胞在一个生长周期中倍增了 3 次，那就要在细胞代数上+3。在实际工作中，这个只是在有限细胞的传代中比较重要，因为这些细胞在接近或到达固定的细胞代数后会进入衰老。

当第一次培养一种细胞系或者是使用没有多少经验的早期培养物时，第一次传代最好使用 1∶2 或 1∶4 的传代比例，注意细胞密度。当已获得培养经验且细胞系已在实验室中建立起来，可以增加传代比率，如降低传代后的细胞密度，但在试图增加传代比率时始终保持一瓶以低比率传代。一旦扩增够了足够细胞并冻存，尽快检测生长曲线（图 12.4）。

即使选定了一个传代比率来确定传代浓度，在胰蛋白酶消化后再接种时也应记录每瓶的细胞数，这样可以估计每次传代后的生长速率并监控其生长的稳定性（参见方案 20.7~方案 20.9），这是细胞培养质量控制的一个重要内容（参见 6.10 节）。否则的话，几代内小的变化很难检测出来，如细胞过于稀释（图 12.6a）或者稀释不够（图 12.6b）。如果由于时间或者仪器的限制，不能在每次传代培养时进行细胞计数，那至少必须在传代前与参考图片比对细胞密度。

作为一般规则，大多数连续细胞系以 1×10^4~5×10^4 个/mL 接种浓度传代，有限成纤维细胞系以大致相同的浓度传代，对于较脆弱的培养物，如内皮细胞和早期几代的上皮细胞，以大约 1×10^5 个/mL 的接种浓度传代。对于一个新的培养物，可以先以高浓度接种，再逐渐降低直至获得合适的生长周期而培养物又无衰退表现。

12.5.4 悬浮培养细胞的扩增

方案 12.2 适用于单层贴壁细胞的传代，大多数原代培养物和连续细胞系均以此方式生长。以悬浮状态连续生长的细胞，或者因为它们是非黏附性的（如许多白血病和鼠腹水瘤，图 12.8），或者因为机械地保持在悬浮状态或选择后的结果，这些细胞可以像细菌或酵母一样传代。悬浮生长的细胞有很多优点（表 12.5），例如，不需要胰蛋白酶消化，传代过程更快，对细胞的创伤更小，扩大培养更容易（另见 21.1 节）。悬浮培养物一般不换液，而是稀释培养物到多个新的培养容器中而扩大培养，稀释至一个新的培养容器并弃掉多余的或者吸弃大部分细胞悬液，将剩余的细胞悬液在原容器中稀释到合适的接种浓度。无论在哪种情况下，都有与单层贴壁细胞相似的生长周期，但通常延迟期较短。

表 12.5 单层与悬浮培养物比较

单层	悬浮
培养物需求	
周期性维持	稳定状态
胰蛋白酶传代	稀释
表面积限制	体积（气体交换）
生长特征	
接触抑制	均质悬液
细胞相互作用	
扩散边界	
用途	
细胞学	大批生产
振荡下来有丝分裂期细胞	批量收获
原位抽提	
连续产物收获	
应用范围	
大多数细胞类型，包括原代	只有转化的细胞和一些造血系统细胞

自发悬浮生长的细胞可以培养于一般培养瓶中，而不需组织培养处理（当然必须是无菌的）。静态培养时培养液的深度原则上与单层细胞相同，即 2~5mm，容许气体交换。当悬浮培养物的深度增加，如体积扩大，则培养基需搅动，这一步骤最好通过将培养瓶放在磁性搅拌器上，借助悬浮旋转的磁力摆的作用而达到目的（图 12.7，另见 21.1 节）。也可用置于旋转支架上的转动培养瓶来搅动悬浮培养物（参见表 7.2，图 21.13、图 21.14）。

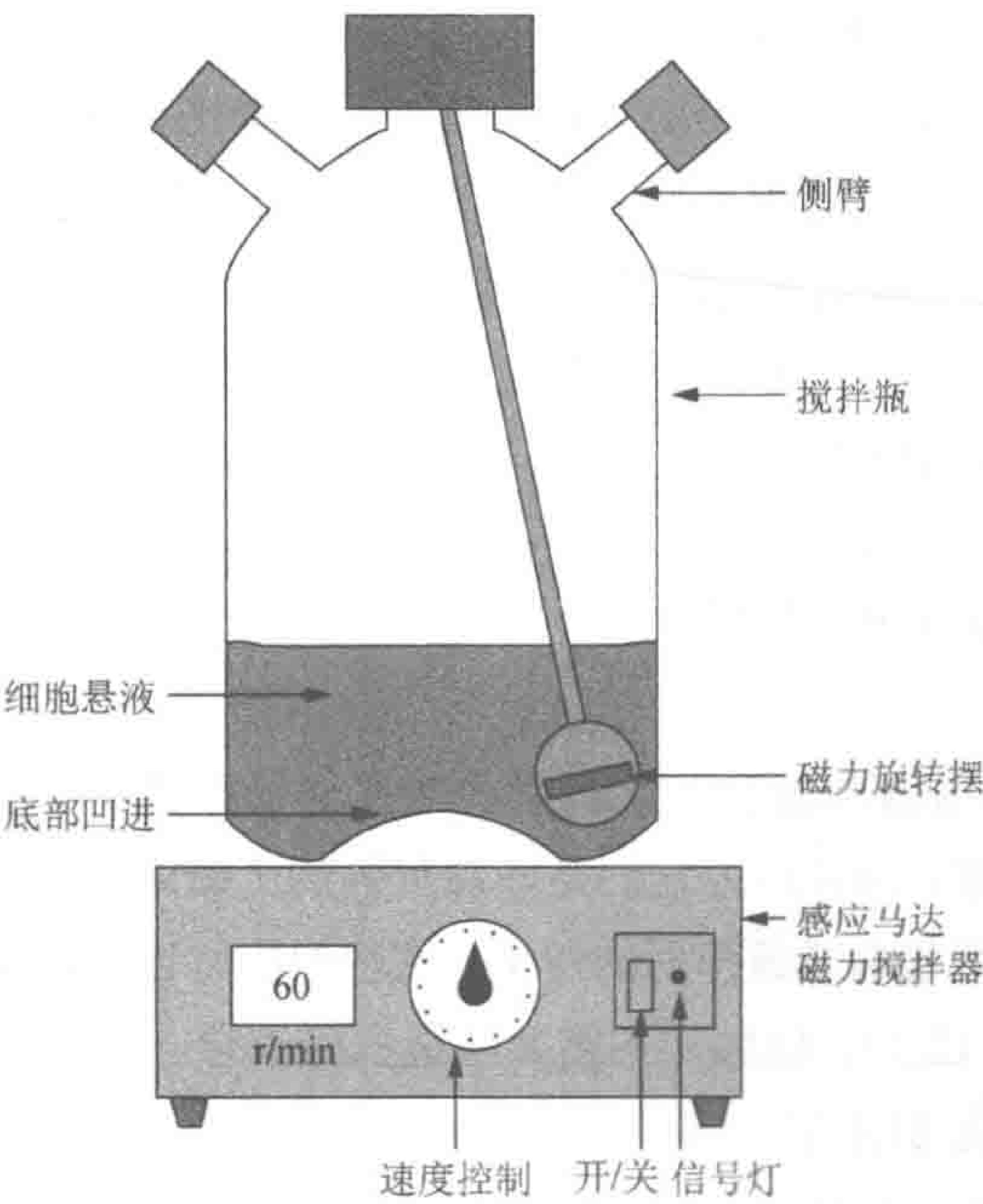


图 12.7 搅拌培养。小型搅拌培养瓶，基于 Techne 的设计，容量 250~1000mL。细胞悬液由旋转摆搅拌，旋转摆在培养瓶底部环形凹槽中旋转

12.5.5　悬浮生长细胞的传代

方案 12.5 描述了将悬浮培养物传代至新容器的常规方法。可以在同一容器中连续传代培养，但在稀释过程中培养瓶颈部少量溅溢不断积累，使污染的可能性逐渐增加。其传代标准和单层贴壁培养物相似：

（1）细胞浓度。大多数悬浮生长的细胞标准培养条件下浓度不应超过 1×10^6 个/mL。

（2）pH。与细胞浓度相关，随细胞浓度的升高而降低。

（3）距离上次传代的时间。与单层贴壁细胞一样，应按固定时间进行。

（4）细胞产物要求。为达到实验或生产的目的。

方案 12.5 可以根据需要调整适应（参见 27.3 节练习 12）。

方案 12.5　悬浮细胞传代

概要

从悬浮细胞培养物中吸取样品，计数，接种适量的悬浮细胞至新培养瓶的新鲜培养基中，使细胞浓度与开始培养时一致（参见图 12.8）。

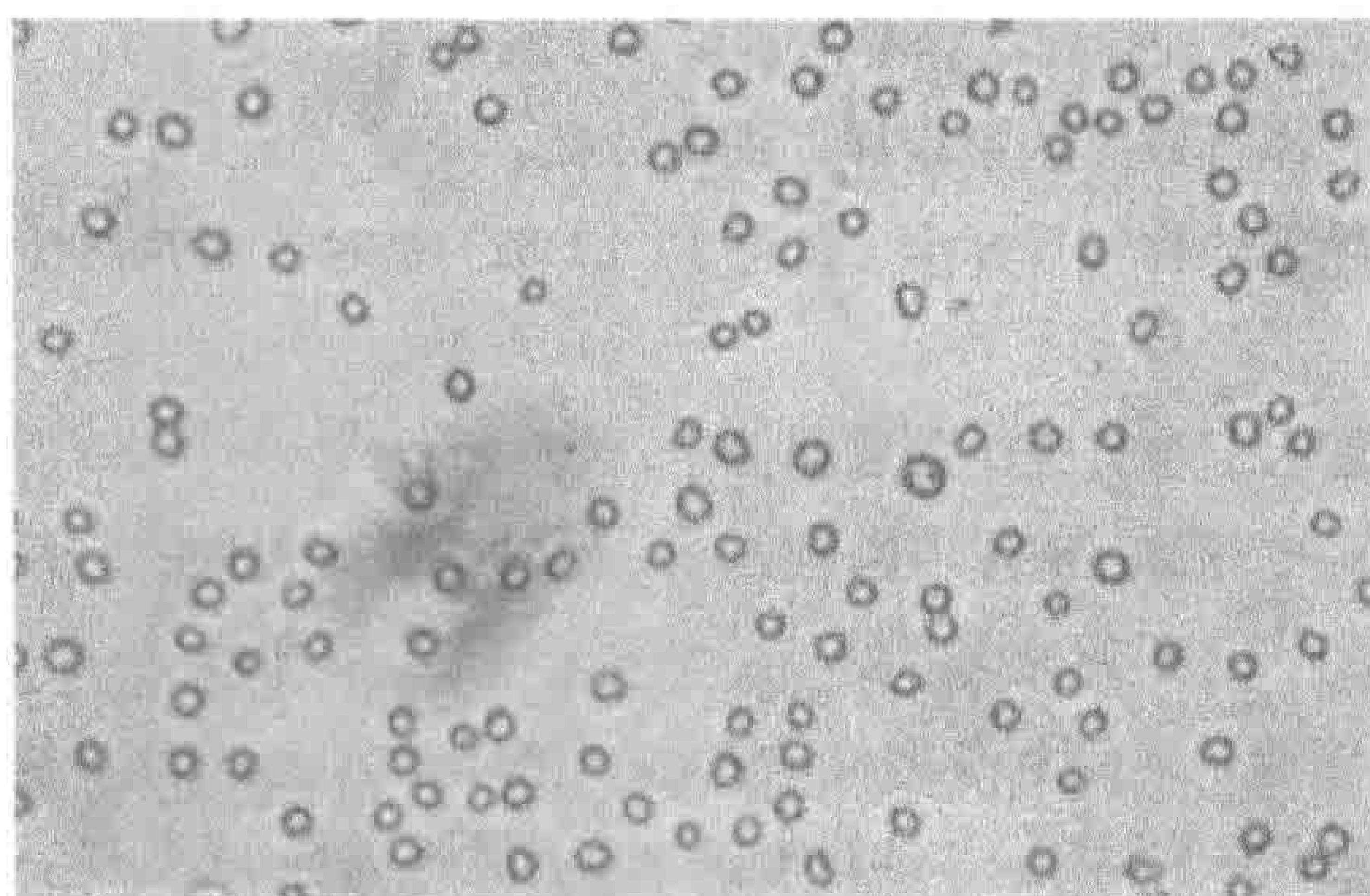


图 12.8　悬浮培养的 HL-60 细胞

材料

无菌

- 起始培养物，培养瓶或搅拌瓶培养　　1
- 生长培养基　　500mL
- 移液管，各种刻度，塞上棉花，按照 1mL、5mL、10mL、25mL 分类装在方形吸管盒中，同方案 12.1
- 用于吸除培养液的未塞棉花吸管，如果有泵和真空吸引管道的话
- 通用容器或 50mL 离心管　　2

- 带磁力摆的1L搅拌瓶（Techne，Bellco；见图7.7和图12.7） 1
- 培养瓶或小的搅拌瓶 2

非无菌

- 移液器或洗耳球（参见图4.2和图5.7）
- 连接真空吸引管道或蠕动泵的废液缸或管子（参见图4.9和图5.8）
- 70%乙醇喷壶
- 无短绒拭子和抹布
- 吸收纸巾
- 带水和消毒剂的吸管桶（参见图4.1）
- 防乙醇记号笔
- 笔记本、笔、操作步骤
- 血细胞计数板或电子细胞计数仪
- 磁力搅拌器

操作步骤

1. 准备好超净台，将试剂及材料放于超净台上准备开始实验（参见5.4节）。

2. 用眼睛观察培养物有无污染或衰退迹象（pH下降、聚集、浮渣、真菌的菌丝或孢子）。这一步骤对于悬浮培养物来说比单层贴壁细胞更难，因为悬浮的细胞使培养基看起来有些浑浊。

3. 显微镜检查：细胞状态不好时表现为皱缩、外形不规则和（或）颗粒化；健康的细胞干净而透明，在相差显微镜下核清晰可见，而且静置培养时常常可见小细胞团。

4. 将培养物放至无菌工作区域，从中取样，细胞计数。

5. 根据上文所述的悬浮培养物传代标准（参见12.5.1节）及对该培养物行为特征的了解决定是否传代；若需传代，如下进行。

6. 混匀细胞悬液，通过上下吹打使小细胞团分散。

7. 向搅拌培养瓶中加入培养基，深度不超过5cm。如果需要更大量的培养基，必须通过气体管道提供CO_2（参见图21.2）。

8. 向各瓶中加入足量细胞。对于生长缓慢的细胞（倍增时间36~48h）终浓度达到1×10^5个/mL；对于快速生长的细胞（倍增时间12~24h），终浓度达到2×10^4个/mL。

9. 向搅拌瓶中通入5% CO_2。

10. 盖好搅拌瓶，在培养箱或37℃温室中，放在磁力搅拌器上，以60~100r/min的转速旋转。注意搅拌马达不要使培养物过度升温。若必要，可在瓶底部加放聚苯乙烯泡沫垫子。电磁感应的搅拌器产热低且无可移动部件。

11. 如果细胞自发变为悬浮生长，可以按相同的浓度接种到一个常规的培养皿和一个小的搅拌培养皿中。这样可以为下面的搅拌培养提供基础。

悬浮培养有很多优点（表12.5）。首先，不需要增加基质表面积就可以生产和收获大量细胞（参见21.1节）。其次，若连续稀释培养物，并使细胞密度保持恒定，就可获得稳定的生长状态（参见21.1.1节）；这种稳定状态很难在单层贴壁培养物中获得。单层贴壁培养物的培养是周期性

的，它依据生长周期时相的不同而有不同的生长速率和新陈代谢水平。

可以根据方案12.4绘制悬浮细胞的生长曲线。利用10个6孔板，在步骤5跳过胰酶消化直接计数，并跳过步骤7和步骤8（参见方案12.4、方案23.9）。

12.5.6 培养条件的标准化

培养条件的标准化对于维持表型稳定是必需的。尽管由于实验需要可改变某些条件，但细胞的建立、生产和日常维持应固守标准的、已确定的条件，包括定期从冻存罐中复苏替换使用的细胞（参见15.5.2节）。

培养基 所使用的培养基品种会影响细胞类型的选择及其表型表达的调节（参见8.6节、9.6节、16.2节、19.7节）。因此，一旦选定了一种培养基，将该培养基标准化；如果购买现成的，选定一个供应商。

血清 去掉血清波动最好的办法就是换为无血清培养基（参见9.2节）。如果不可行，血清替代品（参见9.4.2节）可得到很高的稳定性且一般来说较血清和生长因子添加物便宜，但不能像成分清楚的无血清培养基一样提供对生理环境的控制。如必需血清，选定一批（参见8.6.1节），在培养的每个阶段包括细胞的冻存都使用这批血清。

塑料制品 多数知名品牌的细胞培养瓶和培养皿细胞培养的结果相似，但由于组织培养处理（参见7.1.2节）的不同会有轻微不同，因此最好选定一种培养瓶、培养皿及供应商。悬浮培养使用的塑料培养瓶、培养皿和培养板只需是无菌，不用经过组织培养处理。

12.5.7 抗生素的使用

连续应用抗生素会助长隐形污染，特别是支原体的污染，以及抗生素抗性微生物的产生（参见8.4.7节）。抗生素还可干扰所研究的细胞过程。然而，有些情况下当污染颇易产生或培养特别珍贵的细胞系时，可以应用抗生素。若应用抗生素，重要的是保留一些未用抗生素的储备细胞，以便发现隐形污染；这些储备细胞可以平行培养，轮流使用和不用抗生素（图12.9），直至培养物可不用抗生素。这一过程不适于长期培养，如果怀疑有慢性污染，应丢弃培养细胞或根除污染（参见14.4节、14.5节），然后重新培养时不用抗生素。

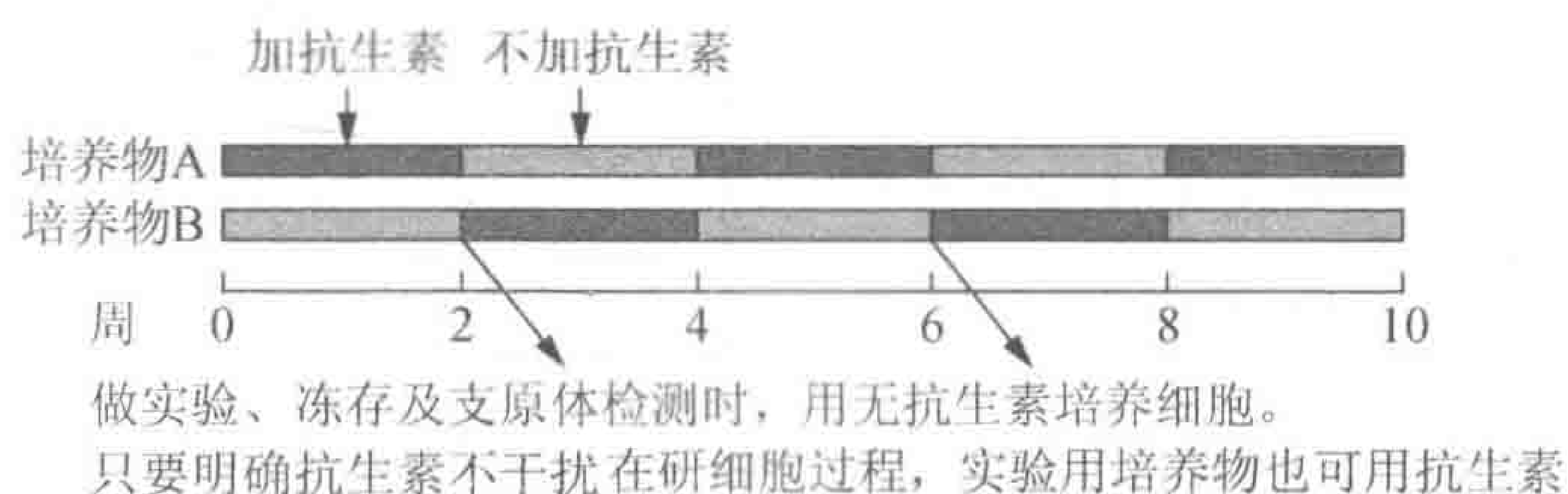


图12.9 平行培养物和抗生素。保持用与不用抗生素平行培养物的推荐示意图。每一培养物都有部分时间不用抗生素

12.5.8 培养记录

常规培养的细节包括换液和传代，都应记录（表 12.6、表 12.7），培养的偏离和改变也应加到该细胞数据库记录中。这些记录是 GLP（参见 6.10 节）要求的，如原代培养记录（参见 11.3.11 节），同时也是任何一个实验室的好习惯（Balls et al.，2006）。如果标准过程已确立，那么只需记录“换液”或“传代”及其时间、细胞数和使用的标准程序。任何有关观察的评述，同时与标准程序的偏离也都应记录。

表 12.6 资料记录：换液

日期　　　　时间　　　　操作者

细胞系	命名				
	原代或传代				
	代数或传代数#				
状态	生长周期时相				
	细胞外观				
	细胞密度				
	培养基 pH（大约）				
	培养基清亮程度				
培养基	类型				
	批号#				
	血清类型和浓度				
	批号				
	其他添加剂				
	CO_2 浓度				
其他参数					

表 12.7 资料记录：传代

日期　　　　时间　　　　操作者

细胞系	命名				
	代数#				
	传代数#				
传代前情况	生长周期时相				
	细胞外观				
	细胞密度				
	培养基 pH（大约）				
	培养基清亮程度				

续表

解离剂	预洗剂				
	胰蛋白酶				
	EDTA				
	其他				
	机械				
细胞计数	悬浮后浓度（C_1）				
	体积（V_1）				
	产量（$Y=C_1 \times V_1$）				
	每一培养瓶产量				
接种	数量（N）和容器类型（培养瓶、培养皿或培养板）				
	最终浓度（C_F）				
	每培养瓶、培养皿，或培养板体积（V_F）				
	传代比率（$Y \div C_F \times V_F \times N$），或培养瓶规格一致时接种瓶数÷胰蛋白酶作用瓶数				
培养基/血清	类型				
	批号#				
	血清类型和浓度				
	批号#				
	其他添加剂				
	CO_2浓度				
包被基质	如纤连蛋白、Matrigel、胶原				
其他参数					

这一系列记录形成了细胞系身世的继续，所有数据，或者至少一些主要事件，如培养基供应商改变、细胞系克隆培养、转染、去污染或换成无血清培养基，要记录在数据库中。

只列出了特殊产品的供应商。一般的试剂，如培养基、胰蛋白酶和培养板列在了“来源和供应商目录”（参见补充材料的附录III、附录IV）。

条目或供应商	网址
Accutase	www.accutase.com
ATCC	www.atcc.org
澳大利亚细胞库	www.cellbankaustralia.com
ECACC	www.phe-culturecollections.org.uk
Falcon 细胞刮	https://us.vwr.com
JCRB	https://cellbank.nibio.go.jp/english

参考文献

Aaronson SA, Todaro GJ (1968). Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. *J. Cell Physiol.* **72**:141–148.

Abercrombie M, Turner AA (1978). Contact reactions influencing cell locomotion of a mouse sarcoma in culture. *Med. Biol.* **56**:299–303.

Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG (1979a). K562—a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **23**:143–147.

Andersson LC, Jokinen M, Klein G, Nilsson K (1979b). Presence of erythrocytic components in the K562 cell line. *Int. J. Cancer.* **24**:5–14.

Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG (1979c). Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature* **278**:364–365.

Balls M, Coecke S, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman LM, Stacey G, Stokes W (2006). The importance of good cell culture practice (GCCP). *ALTEX* **23**(suppl.):270–273.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**:370.

Bernstein A (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1441–1445.

Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**:1171–1180.

Boukamp P, Petrusevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A (1988). Normal keratinisation in a spontaneously immortalised, aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**:761–771.

BrainBits papain protocol (www.brainbitsllc.com/papain-protocol-for-cell-dissociation/).

Buonassisi V, Sato G, Cohen AI (1962). Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:1184–1190.

Coon HD (1968). Clonal cultures of differentiated rat liver cells. *J. Cell Biol.* **39**:29a.

Dawe CJ, Potter M (1957). Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* **33**:603.

De Larco JE, Todaro GJ (1978). Epithelioid and fibroblastoid rat kidney cell clones: Epidermal growth factor receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J. Cell Physiol.* **94**:335–342.

De Vitry F, Camier M, Czernichow P, Benda P, Cohen P, Tixier-Vidal A (1974). Establishment of a clone of mouse hypothalamic neurosecretory cells synthesizing neurophysin and vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:3575–3579.

DelVecchio P, Smith JR (1981). Expression of angiotensin converting enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **108**:337–345.

DSMZ (www.dsmz.de/).

Dunham LJ, Stewart HL (1953). A survey of transplantable and transmissible animal tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **13**:1299–1377.

Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from breast carcinomas. *Cancer Res.* **38**:3352–3364.

Epstein MA, Barr YM (1964). Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1**:252.

Federoff S (1975). In Evans VJ, Perry VP, Vincent MM (eds.), *Manual of the Tissue Culture Association*, Vol. 1, pp. 53–57.

Fogh J (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**:209–214.

Fogh J, Trempe G (1975). In FoghJ (ed.), *Human tumor cells in vitro.* New York: Academic Press, pp. 115–159.

Gaush CR, Hard WL, Smith TF (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931–933.

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**:364–365.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik K, Parks WP (1972). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**:1417.

Gluzman Y (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175–182.

Goh S, Ong PF, Song KP, Riley TV, Chang BJ (2007). The complete genome sequence of Clostridium difficile phage phiC2 and comparisons to phiCD119 and inducible prophages of CD630. *Microbiology* **53**:676–685.

Goy A, Ramdas L, Remache YK, Gu J, Fayad L, Hayes KJ, Coombes KR, Barkoh BA, Katz R, Ford R, Cabanillas F, Gilles F (2003). Establishment and characterization by gene expression profiling of a new diffuse large B-cell lymphoma cell line, EJ-1, carrying t(14;18) and t(8;14) translocations. *Lab. Invest.* **83**:913–916.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type. *J. Gen. Virol.* **36**:59–72.

Green H, Kehinde O (1974). Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1**:113–116.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**:585–621.

Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, Taylor L, Darlington G (1992). SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**:136–142.

Hopps H, Bernheim BC, Nisalak A, Tjio JH, Smadel JE (1963). Biologic characteristics of a continuous cell line derived from the African green monkey. *J. Immunol.* **91**:416–424.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK1. *In Vitro* **12**:670–677.

ICLAC (International Cell Line Authentication Committee) (2014) (http://iclac.org/).

Jacobs JP (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**:168–170.

Jacobs JP, Garrett AJ, Meron R (1979). Characteristics of a serially propagated human diploid cell designated MRC-9. *J. Biol. Stand.* **7**:113–122.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**:497–499.

Koren HS, Handwerger BS, Wunderlich JR (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a murine tumor cell line. *J. Immunol.* **114**:894–897.

Liebermann D, Sachs L (1978). Nuclear control of neurite induction in neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* **113**:383–390.

Littlefield JW (1964). Three degrees of guanylic acid pyrophosphorylase deficiency in mouse fibroblasts. *Nature* **203**:1142–1144.

Macpherson I, Stoker M (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* **16**:147.

Malter M, Süss R, Fischer H (1987). Natural cytotoxic cells from rat liver and spleen kill human glioma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **113**:498–501.

Maltese WA, Volpe IJ (1979). Induction of an oligodendroglial enzyme in C-6 glioma cells maintained at high density or in serum-free medium. *J. Cell Physiol.* **101**:459–470.

McGarrity GJ (1976). Spread and control of mycoplasmal infection

of cell cultures. *In Vitro* **12**: 643–648.

McKeehan WL (1977). The effect of temperature during trypsin treatment on viability and multiplication potential of single normal human and chicken fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **1**:335–343.

Moore GE1, Sandberg AA, Ulrich K (1966). Suspension cell culture and in vivo and in vitro chromosome constitution of mouse leukemia L1210. *J. Natl. Cancer Inst.* **36**:405–413, 415–421.

Morgan JE, Moore SE, Walsh FS, Partridge TA (1992). Formation of skeletal muscle in vivo from the mouse C2 cell line. *J. Cell Sci.* **102**:779–787.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). BioSample database (www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/).

Nichols WW, Murphy DG, Christofalo VJ (1977). Characterization of a new diploid human cell strain, IMR-90. *Science* **196**:60–63.

Nicola NA (1987). Hemopoietic growth factors and their interactions with specific receptors. *J. Cell Physiol.* (suppl.) **5**:9–14.

Nilos RM, Makarski JS (1978). Control of melanogenesis in mouse melanoma cells of varying metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **61**:523–526.

Olsson I, Ologsson T (1981). Induction of differentiation in a human promyelocytic leukemic cell line (HL-60). *Exp. Cell Res.* **131**:225–230.

Pontén J, Macintyre EH (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**(4):465–486.

Puck TT, Marcus PI (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**:432–437.

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958). Genetics of somatic mammalian cells; III: Long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**:945–956.

Reddel R, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* **48**:1904–1909.

Richler C, Yaffe D (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* **23**:1–22.

Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH Jr. (1979). Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell Biol.* **81**:635–648.

Sanford KK, Earle WR, Likely GD (1948). The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**:229.

Schaeffer WI (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:97–101.

Scher W, Holland JG, Friend C (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro; I: Partial purification and identification of hemoglobins. *Blood* **37**:428–437.

Schousboe A, Thorbek P, Hertz L, Krogsgaard-Larsen P (1979). Effects of GABA analogues of restricted conformation on GABA transport in astrocytes and brain cortex slices and on GABA receptor binding. *J. Neurochem.* **33**:181–189.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Teterson WD, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50**:6075–6086.

Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**:1409–1416.

Tsuruo T, Hamilton TC, Louis KG, Behrens BC, Young RC, Ozols RF (1986). Collateral susceptibility of adriamycin-, melphalan-, and cisplatin-resistant human ovarian tumor cells to bleomycin. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**:941–945.

Yasamura Y, Tashijian AH, Sato G (1966). Establishment of four functional clonal strains of animal cells in culture. *Science* **154**:1186–1189.

Young GM, Levison SW (1997). An improved method for propagating oligodendrocyte progenitors in vitro. *J. Neurosci. Methods* **77**:163–168.

Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MMY, Aghajani S, Busse M, Yuan J, Lee G, Peale F, Klijn C, Bourgon R, Joshua S. Kaminker JS, Neve RM. (2015). A resource for cell line authentication, annotation and quality control. Nature 520, 307–311. doi:10.1038/nature14397.

Zhao M, Sano D, Pickering CR, Jasser SA, Henderson YC, Clayman GL, Sturgis EM, Ow TJ, Lotan R, Carey TE, Sacks PG, Grandis JR, Sidransky D, Heldin NE, Myers JN (2011). Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin. Cancer Res.* **17**:7248–7264.

（冯海凉　刘玉琴　译）

第 13 章

身份认证和验证

细胞系的验证有如下 4 个主要方面。

（1）身份认证：该细胞是所宣称的细胞吗？

（2）其身世：细胞系是如何衍生和维持的？从最初起始，在其身上都发生了些什么？

（3）微生物感染：细胞系是否没有已知微生物的污染？

（4）质量保证：细胞系是否表现应有的生长特性、表型表达？是否对培养用制剂、培养基进行了恰当的检测？培养设施和仪器是否维护得当？

13.1　细胞系的身份认证

细胞系的衍生和维持面临许多变数：包括培养基、基质、传代步骤、孵育及储存。任何一项变动均可导致细胞的表型漂移，所以这些条件在培养时必须保持恒定维持一致。控制一致性最关键的因素是检测和守护细胞的身份。如果已经不是所设想的细胞，由此获得的结果，最好，也是打折了的；最差，就是无效的。

13.1.1　错误身份认定和交叉污染

扩增和冷冻保存延长了培养物的寿命和有效性，同时也增加了其交叉污染的风险。实验室中不止一个细胞系在培养时，从一个细胞系偶然引入另一个的风险永远存在，而且，如果污染的细胞生长速度快的话，就会压过并取代原来的细胞系（另见 18.2.1 节、14.6 节）。组织培养发展过程中，大量细胞株倍增时间短、贴壁率高。虽然这些特点使这些细胞系成了有价值的实验材料，但也使它们具有了交叉污染其他细胞系的潜在危险。由此产生的细胞系身份认证错误还可因传代及冷冻保存的错误叠加一起使得情况更为复杂。

现已证实 20 世纪 60 年代后期在美国使用的大多数连续细胞系已与 HeLa 细胞发生交叉污染（Gartler，1967；Nelson-Rees and Flandermeyer，1977；Lavappa，1978），这些证据率先将这一严峻问题曝光。交叉污染首先在酶多态性研究（Gartler，1967）中发现，后来经染色体分析证实（Nelson-Rees and Flandermeyer，1977）。遗憾的是，这个问题没有受到这些早期揭露的影响，不仅未像人们预期的那样减少，反而大规模增长，这已经经过多家细胞库、独立实验室通过广泛 DNA 谱测定而确认了。同时显示累及了更多受害者和“反面”细胞系（Nelson-Rees et al.，1981；Macleod et al.，

1999；Stacey et al.，2000；Boonstra et al.，2007；Liscovitch and Ravid，2007；Laxroix，2008；Phuchareon et al.，2009；Capes-Davis et al.，2010；Torvik et al.，2010；Capes-Davis et al.，2013a）。最初是测DNA 指纹（图 13.1），近来测 DNA STR 谱（图 13.2），业已积累了 470 余有档案细胞系已经不是所声称的细胞系（参见附录Ⅵ和 ICLAC，2015）。有些更常用的身份错误细胞系列于表 13.1 中，但这些只是例子，完整的目录网上有（ICLAC，2015）。获取新细胞系之前，需要查询一下这张表。实际上新的污染时有发生，虽然不幸但可以理解。在 1967~1977 年这 10 年报道的那些污染细胞系仍在广泛使用这一事实，是对有些时候细胞培养教授方法的可怕的惩罚，甚至是对更年长的科学家，尤其是那些参与投稿评阅和项目经费评审的科学家缺乏认识的可怕的惩罚（Buehring et al.，2004）。

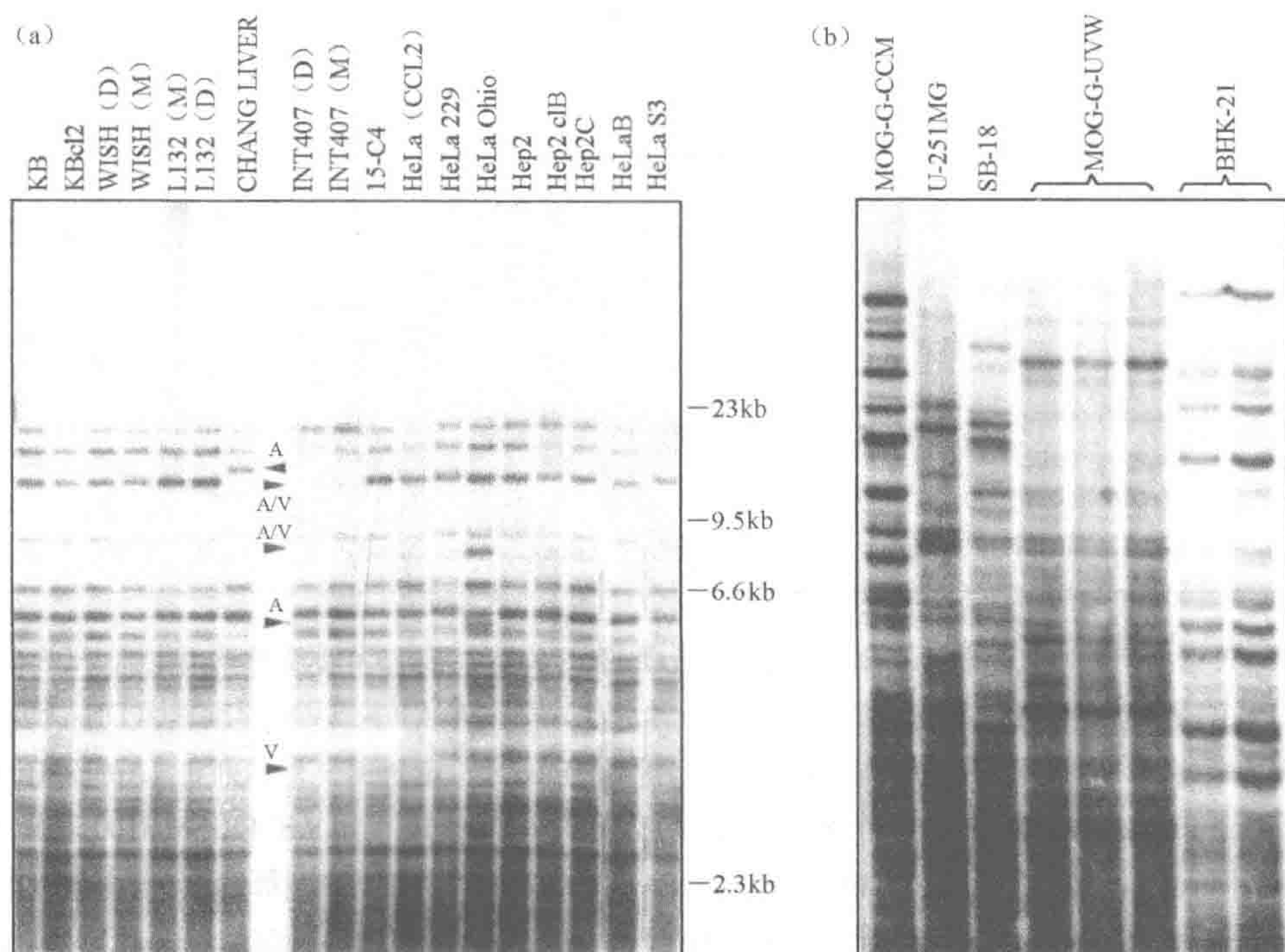
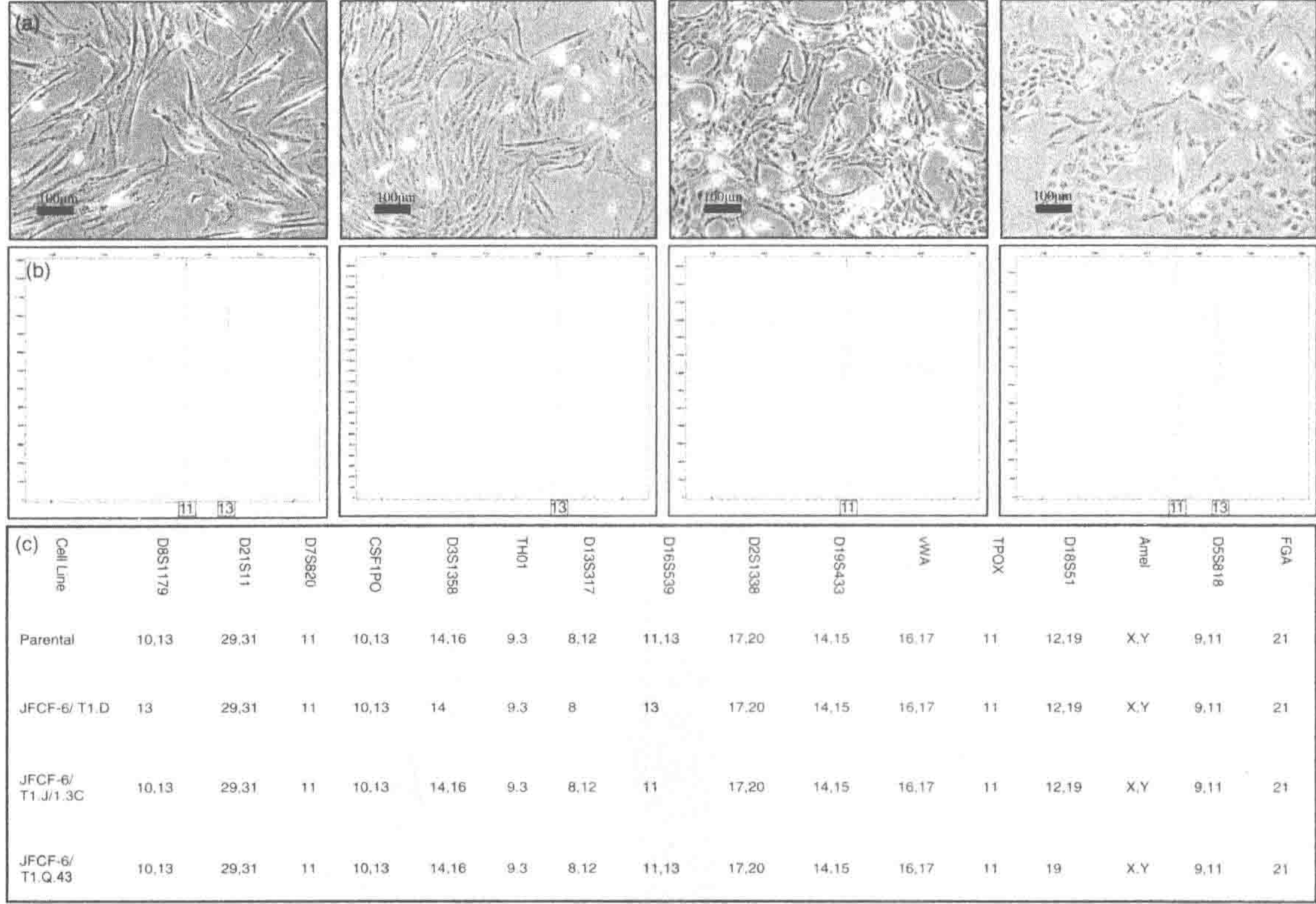


图13.1 DNA 指纹。用*Hin*f Ⅰ限制性内切酶酶切并用小卫星探针杂交得到细胞系DNA的Southern印迹（Jeffreys et al.，1985）。（a）HeLa 细胞污染的细胞系及 HeLa 亚克隆的 DNA 指纹。所分析的主细胞库（M）与衍生的工作库或分发库（D）的带谱相同。各细胞系的 DNA 指纹图谱通常是恒定的，但有时出现额外的区带（A）或变异的区带（V）（如 HeLa、Ohio、INT 407 和 Change Liver）（G Stacey，NIBSC，UK 馈赠）；（b）4 种人类胶质瘤细胞系——MOG-G-CCM、U-251MG、SB-18 和 MOG-G-UVW（3 批冻存）和 BHK-21 作对照的两条泳道显示了不同的 DNA 指纹（G Stacey，NIBSC，UK 馈赠）

使用标准的 STR 谱（Barallon et al.；ANSI/ATCC ASN-0002-2011）国际细胞系 DNA 谱数据库已创立（ICLAC，2015；Dirks et al.，2010），包括那些以前报道是交叉污染的（Capes-Davis et al.，2010）。使用 ANSI/ATCC ASN-0002-2011 标准检测 STR 谱对细胞系进行真实性认证时应该查询这个数据库。与正确细胞系 80%以上的匹配可确认其真实性，与另一个不同细胞系匹配表明该细胞系身份错误，不应该再用了。找不到 80%及以上的匹配细胞则提示该细胞系是独特的。

尽管用这些身份错误细胞发表的某些文章中的某些方面仍是非常有效的，例如，与细胞起源无关的分子过程，但是如果试图将细胞行为与起源组织或起源肿瘤关联，交叉污染的细胞就



Cell Line	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA
Parental	10,13	29,31	11	10,13	14,16	9.3	8,12	11,13	17,20	14,15	16,17	11	12,19	X,Y	9,11	21
JFCF-6/ T1.D	13	29,31	11	10,13	14	9.3	8	13	17,20	14,15	16,17	11	12,19	X,Y	9,11	21
JFCF-6/ T1.J/1.3C	10,13	29,31	11	10,13	14,16	9.3	8,12	11	17,20	14,15	16,17	11	12,19	X,Y	9,11	21
JFCF-6/ T1.Q.43	10,13	29,31	11	10,13	14,16	9.3	8,12	11,13	17,20	14,15	16,17	11	19	X,Y	9,11	21

图 13.2 STR 谱的产生和注释举例。给出了测定成纤维 JFCF-6 细胞株和 3 个永生化的衍生株 JFCF-6/TI.D、JFCF-6/T1.J/1.3C 和 JFCF-6/T1.Q.43 的 STR 谱测定的一个例子。衍生株经转染 SV40 早期基因 DNA 而建立，由澳大利亚细胞库处置、培养并返回。每株细胞的 DNA 用 AmpFISTR 检定 PCR 扩增试剂盒（Appied Biosystem，Mulgrave，Australia)，该试剂盒包含 16 个 STR 位点的引物。扩增产物的序列用 ABI PRISM 3100 基因分析仪分析，数据由 GeneMapper ID 软件评定（Appied Biosystem）。(a) 每种培养物的图，衍生系与母系形态比较（标尺=100μm)，每种衍生物有明显不同的形态，提示需身份认证确认其为与母系对应的衍生系；(b) 每种培养物 STR 的 D16S539 位点扩增峰例子。3 个 JFCF-6 衍生细胞株建立过程中因为有基因漂移，这个位点的扩增峰有变化。所显示的与特定基因位点已知大小对应的峰，经由试剂盒提供的分子量大小标准及对照验证（数据未显示)；(c) JFCF-6 及其衍生株的 STR 谱；(b) 中显示的位点，D16S539，用灰色标出。尽管由基因漂移导致的不同，衍生株的谱与母系的谱匹配很好，所有这些培养物的证明正确（摘自 Capes-Davis et al.，2010）

完全无效了，如果又没有告知错误的身份（这部分工作可能被别人引用），如果由此得出的科学结论还可接受，那么投稿不必拒掉（如已发表的话或撤稿），但细胞的真实身份必须告知，细胞的名称作相应的修改，如 HeLa-KB 或 HeLa-Hep2。

这是所有使用细胞培养群体共同的责任，告知细胞身份错误问题的存在，确保这一信息传播到使用细胞系开展工作的人群中。责任尤其落在：①教师和导师，他们必须使学生和受训者铭记这些风险的严重程度；②杂志编辑，要让审稿者意识到有必要拒绝那些未进行细胞系身份认证的投稿，并通过与 ICLAC 网站（ICLAC，2015 数据库）的链接提供判断，网站上有身份错误细胞数据库的链接及给科学家就如何对待这个问题的建议（ICLAC，2015 资源)；③项目资助机构，拒绝没有提供所用细胞系合适真实性证据的建议书。不接受这些约束，这种状况只能更糟糕。

表 13.1 常用的交叉污染细胞系（全部错误细胞见 ICLAC，2015）

细胞系	认定种属	认定细胞类型	污染源	实际种属	实际细胞类型	参考文献
ALVA-31,41	人	前列腺癌	PC-3	人	前列腺癌	Varella-Garcia et al.，2001
BrCA 5	人	乳腺癌	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees et al.，1981
CaOV	人	卵巢癌	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
CHANG Liver	人	胚胎肝上皮	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
COLO-818	人	黑色素瘤	COLO-800	人	黑色素瘤	Macleod et al.，1999
Detroit-98	人	胸骨骨髓	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
ECV-304	人	正常内皮	T-24	人	膀胱癌	Dirks et al.，1999
EJ-1	人	膀胱癌	T-24	人	膀胱癌	Azari et al.，2007
Girardi Heart	猪	成年心脏	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
HBL-100	人	乳腺转化非致瘤细胞	未知	人	未知；非女性	ATCC
HBT-3	人	乳腺癌	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
HEK	人	胚胎肾	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
HEp-2	人		HeLa	人	宫颈腺癌	JCRB
INT 407	人	胚胎小肠上皮	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
KB	人		HeLa	人	宫颈腺癌	ATCC；JCRB
L132	人	胚胎肺上皮	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
McCoy	人	滑膜细胞	Strain L	鼠	结缔组织	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976
MDA-MB-435	人	乳腺癌	M14	人	黑色素瘤	Ellison et al.，2003；Christgen and Lehmann，2007；Rae et al.，2007
MCF-7ADR	人	乳腺癌（阿霉素抗性的 MCF-7）	OVCAR-8	人	卵巢癌	Liscovitch and Ravid，2006
MOLT-15	人	T 细胞白血病	CTV-1 M14/MD	人	单核细胞白血病	Macleod et al.，1999
NPA87	人	甲状腺癌	A-MB-435S	人	黑色素瘤	Schweppe et al.，2008
PC-93	人	前列腺癌	HeLa	人	宫颈腺癌	Van Bokhoven et al.，2003
PPC-1	人	前列腺癌	PC-3	人	前列腺癌	Varella-Garciaet al.，2001
TE-671	人	髓母细胞瘤	RD	人	横纹肌肉瘤	Stratton et al.，1989；Chen et al.，1989
U-373 MG	人	胶质母细胞瘤	U-251 MG	人	胶质母细胞瘤	Ishii et al.，1999
WISH	人	新生羊膜上皮	HeLa	人	宫颈腺癌	Nelson-Rees and Flandermeyer，1976

13.1.2 错误身份认定和交叉污染的原因

错误身份认定有多种原因，但主要是操作、标记及文档记录等水平差。怎么强调都不过分，错误认定的细胞系确实存在，而且新的错误还会且肯定会发生，原因如下（表13.2）。

表13.2 交叉污染和错误识别的原因和预防

原因	预防
细胞系来源	
从未经验证的来源获得细胞	仅使用可信赖的来源，如有声誉的细胞库。如果不能从有声誉的细胞库获得细胞，在接收和使用前进行真实性认证
将未经鉴定的细胞系转给他人	不传播未经真实性认证的细胞，把需要者介绍给细胞库，从细胞库他们可以得到细胞，或确保已经做了必要的真实性认证再传播
处理	
同时处理生长快的细胞和生长较慢的细胞	总是最后处理生长快的细胞系，处理前先将其他培养物及培养基移走
在接触细胞后，将移液管放回培养基或试剂瓶	移液管进入培养有细胞的培养瓶后，不要放回培养基或试剂瓶
气溶胶在敞开的培养物间传递	不要同时打开两个不同的细胞系进行培养
使用未塞棉花的移液管	一直使用塞棉花的移液管（除非用于抽吸，而后必须丢弃）
使用未塞棉花的移液管	细胞传代时使用塞棉花的移液管
质量保证	
没有观察检查培养物	在处理细胞前，总是在显微镜下检查培养物。参照标准图片
没有进行真实性检测	引入新细胞系时，进行真实性检测（参见13.1.4节）
公用	
与同事共用培养基和（或）移液管	不要共用培养基或移液管
与同事共用工作空间	不要共用层流安全柜或任何其他工作空间，除非工作对象为同一细胞系
不同细胞系共用同一瓶培养基、试剂和移液管	每个细胞系总是使用一套单独的培养基和其他试剂（胰酶、D-PBSA、EDTA等）
错误识别	
再培养时标记错误	总在接种细胞前标记培养瓶、培养板和培养皿，加入细胞时再检查
冻存时标记错误	在加入细胞前标记冻存管，并且一次仅处理一个细胞系
复苏时混淆冻存管	使用冻存时不会褪色的永久标记（参见15.3.5节）。复苏前仔细检查标记
库存管理差导致复苏错误的冻存管	备份手写或计算机记录，在冻存管盖或其他设备上使用彩色标记
复苏时接种到错误的培养瓶	标记培养瓶、加培养基，再解冻细胞，一次复苏一个细胞系
在冻存库中不小心将冻存管从一个冻存杆转移到另一个冻存杆	给冻存杆加鞘
在冻存库中不小心将冻存管从一个冻存盒转移到另一个冻存盒	不要移动冻存管，除非确定其身份，在放回原处前复核其正确位置

（1）引进未认证的存货。细胞系应该是能保证其真实性认证的来源引进，如从知名的细胞库（参见15.5节）。如果不可能，那细胞系必须面对检疫（参见14.1.8），进行正确的真实性认证程序（参见13.1.4节）。

（2）细胞系建立者的狂热。一个新细胞系的产生带来的兴奋常导致建立者发表并分发该细胞系，而没有进行适当的身份认定。有时一个实验室的所有细胞到头来是一个，如食管癌HCu系列细胞系（Van Helden et al.，1988）。

（3）技术差。液体溅出、溢出、产生气溶胶、触碰已有细胞的培养器皿的内面、吸管的再用。

（4）使用未加棉塞的吸管。吸管或移液枪头必须加塞，尤其是用于库存传代时，细胞可意外吸进移液管中并转到下一次吸液中。

（5）标记错误。在培养瓶或培养皿上写错了标记，或把细胞传到标记错误的培养瓶皿中及传代时记录不准确。

（6）观察技术差。日常处理，特别是传代时，没在显微镜下观察培养物。

（7）每次传代时没有计数细胞。生长速度的改变未记录，被生长快的细胞系盖过没察觉。

（8）同时操作不止一个细胞系。这样的话增加了移液枪从一种培养物到不同的培养物或错误的培养基中的机会。用移液器还可产生气溶胶，气溶胶可含细胞。

（9）不同的细胞系用同一培养基。培养基和其他试剂在不同细胞系间共用时，一个细胞系的细胞可能被不经意地引入到另一个细胞系的培养液中。

（10）多人共用。如果多个人共用培养基和试剂，一个人的错误会传给其他人。

（11）标记错误或冻存时放错位置。冻存管可能标记错误，或冻存管中加入了错的细胞，或冻存管被插入了冰箱中错误的位置。

（12）复苏时选错了冻存管。没有正确阅读冻存记录，或保藏控制系统错误或误解导致解冻了错误的冻存管。解冻后标签会变得不清楚。还可能是冻存管从一个杆移到另一个杆，而杆未装外鞘。

13.1.3 避免错误身份认定和交叉污染

要避免交叉污染，根本是采取恰当预防措施并识别引入实验室的错误认定的细胞系。利用细胞系开始工作之前，就要做这些。不能工作完成准备发表时再做。医学做法应该遵守如下几方面。

（1）获得细胞系之前，确保这个细胞系不在错误认定细胞系数据库的目录中（ICLAC，2015）。

（2）从有声誉的细胞库获取细胞。

（3）如果没有真实性认定的证书（参见13.1.4节；另见补充材料中的附录III），收到细胞后进行身份认证并与STR谱数据库查对（ICLAC，2015）。

（4）标记培养器皿明确、清晰无歧义。

（5）每次处置一个细胞系，完成后擦干净。

（6）处理完其他细胞后再处理增殖快的细胞系。

（7）绝不用同一个加样器处理不同细胞系。

（8）每个细胞系专用一套培养基和其他试剂。

（9）吸管进过有细胞的培养瓶之后，不要把吸管再放回到培养基或胰蛋白酶等瓶中。

（10）在培养瓶中先加培养基和试剂，后加细胞。

（11）作为常规，不用没有塞的吸管或枪头。

（12）经常检查细胞的特性，任何形态、生长速度或其他表现的突发变化都要质疑。

（13）开始建立新的细胞系时保留捐赠者的DNA或组织。

13.1.4 细胞系身份认证的技术

认定错误可用DNA STR谱测定（参见方案13.1）、同工酶分析（O'Brien et al.，1980）或核

型分析（Nelson-rees and Flandermeyer，1977）（参见13.1.9节；方案13.3、方案13.4）而识别。DNA绘谱是首选，而且已确定一整套标准检测条件（ANSI/ATCC ASN-0020-2011）。

13.1.5 DNA绘谱

主要的细胞库（如ATCC、DSMZ、ECACC，还可参见表15.5）为人类细胞系的真实性提供身份检测服务（短篇综述13.1）。此外还有多家商业公司提供这项服务（参见补充材料中的附录III，DNA绘谱）。但作者不能保证任何一个机构提供的服务的质量，当选择这些公司的时候，询问某些特定的问题很重要，可以确信这些公司将提供你所需要的服务。这些问题包括：

（1）他们自己进行检测操作还是外包检测服务？

（2）用来进行个体鉴定的方法的特异性怎样？

（3）所使用的基因标志记是否与专业机构或其他专家中心所用的标记物挂钩且检测与ANSI标准一致（ANSI/ATCC ASN-0002-2011）？

（4）他们在解读细胞系数据时是否有经验？

（5）他们在该方法上是否有内部经验来协助解读结果？

（6）他们是否有适当的专业或政府机构认可，或他们是否有一个专家小组或组织的正式从属关系？

方案13.1 细胞系的DNA STR谱的测定

下列方案由A. Meredith提供并由M. Ojo Amber Meredith、P. Böhme、V. Micheal更新。Ojo@LGC-Group.com LGC标准，Queens Road，Teddington,Middlesex，TW11 0LY，UK（www.lgc. co.uk）。

因为微卫星序列很小，可以用来鉴定和定量特定基因位点的短重复序列（STR）。第二代复合体系（SGM）检测基因组的7个不同区域，Promega PowerPlex16 HS检测16个位点，分辨能力达1∶10^9。到目前为止，这一体系只用于人类细胞系，但非人类DNA谱的测定在增加（Almeida et al.，2011；O'Donoghue et al.，2011）。STR谱测定的主要好处之一是产生大量互联网可访问（ATCC STR Database, DSMZ STR Database，NCBI STRDatabase）且不同实验室间可互换的数据（Masters et al., 2001；Langdon，2004）。有几个实验室包括LGC和ATCC可以提供DNA绘谱服务。

背景

细胞系间交叉污染长期存在，且是导致科学误解的常见原因。据估计，高达36%的细胞系与所称不符。利用Promega PowerPlex16 HS进行的STR绘谱提供了快速而便宜的确定细胞系STR谱的方法，可被不同实验室重复（Masters et al.，2001）。

概要

用EZ DNA Investigator 试剂盒或Qiagen® QIAamp®迷你试剂盒从细胞团提取DNA；抽提到的DNA用Promega PowerPlex16 HS在16/96光学孔板中扩增，然后用ABI3XX系列DNA测序仪（图13.3）进行毛细管电泳，再用GenotMapper®软件进行分析。

A. 细胞团抽提

自动程序使用 EZ DNA Investigator 试剂盒

材料

- EZ DNA Investigator 试剂盒（Qiagen）
- EZ 机器人（如 Qiagen 的 Advanced XL、Advanced、BioRobot）
- 小离心管，2.0mL（如旋盖的 Sarstedt tubes，有底座的）
- 离心机（如 Eppendorf 5424 或相似规格）

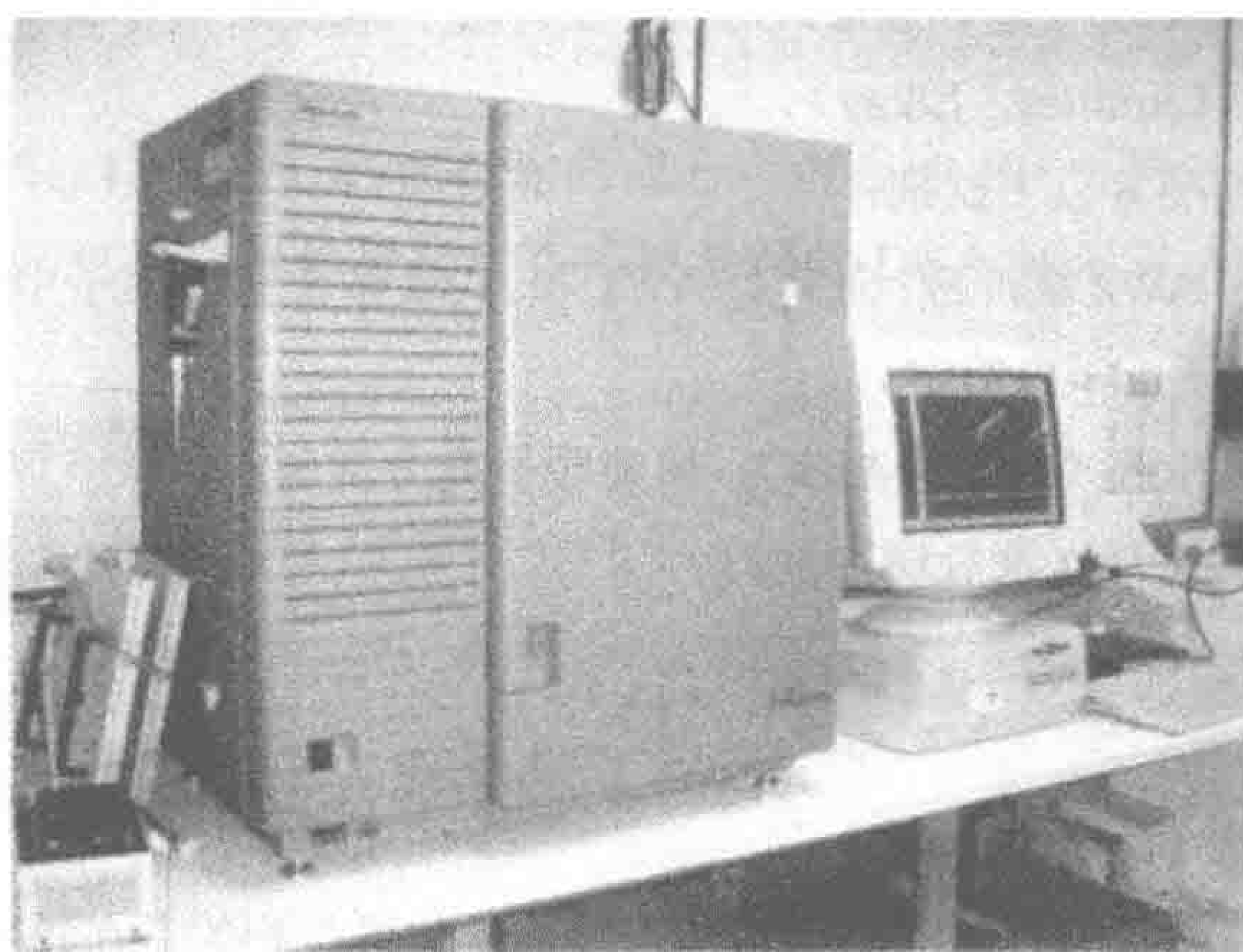


图 13.3 DNA 测序仪。ABI377 DNA 测序仪，利用自动凝胶分析系统在聚丙烯酰胺凝胶上分离和定量扩增的 STR 序列（由 LGC Promochem 公司的 A. Meredith 授权使用），这是原来使用的电泳，实际工作中，这套系统已被方案 13.1 所描述的毛细管电泳取代

- 涡流混合器
- 一次性塑料吸管（Liquittes，Elkay）

操作步骤

1. 把样品以 20 000*g* 离心 3min。
2. 用细尖吸管，小心遗弃上清液，不要搅动细胞团。
3. 用 200μL PBS 重悬细胞。
4. 重复步骤 1、2。
5. 用 200μL PBS 重悬细胞。
6. 用涡流混旋器快速混合各个有细胞的离心管。
7. 取 490μL G2 缓冲液、10μL 蛋白酶 K 加到带标记的 2mL 空管中。
8. 每个样品取 100μL，加到上述相应的含 G2 缓冲液混合物的管中。
9. 每管用涡流混合器快速混匀，约 15s。
10. 20 000*g* 离心 3s。
11. 把离心管转到 EZ1 机器人（运行 QL 程序）。
12. DNA 样品置 4℃保存至扩增（如果不是马上扩增，样品应该–20℃保存）。

手动程序使用 QIAamp® DNA 迷你试剂盒

材料

- QIAamp® DNA 迷你试剂盒含蛋白酶 K（Qiagen）
- 小离心管，1.5mL（如 Eppendorf Biopure Safelock Tubes）
- 离心机（如 Eppendorf 5424 或相似规格）
- 水浴或可以维持 56℃的烤箱
- 涡流混合器
- 无水乙醇
- 磷酸缓冲液，0.01mol/L（如 Sigma PBS 片，2 片溶于 400mL 水中）
- 一次性塑料吸管（Liquittes，Elkay）
- 开始实验前，必须准备以下试剂：

  (i) Qiagen AW1 和 AW2 缓冲液：向装有 AW1 和 AW2 浓缩液的瓶子中加入适量无水乙醇。AW1 和 AW2 缓冲液在室温下一年内稳定。

  (ii) Qiagen AL 缓冲液（裂解缓冲液）：用前颠倒充分混匀。

  (iii) Qiagen AE 缓冲液（洗脱缓冲液）。

操作步骤

（试剂盒生产商的操作步骤，稍加修改）

如果细胞不是培养基悬浮的细胞悬液，从步骤 5 进行。如果收到的是在培养基中的细胞团：

1. 样品 20 000*g* 离心 3min。
2. 用细尖移液管，小心移弃上清液。
3. 用 200μL PBS 重悬细胞。
4. 重复步骤 1、2 一次。
5. 用 200μL PBS 重悬细胞。
6. 将 20μL Qiagen®蛋白酶 K 加到标记好的 1.5mL 空离心管中。
7. 取 200μL 各样品，加到相应标记的已加蛋白酶的离心管中。
8. 每管中加 200μL AL 缓冲液。
9. 每管用涡流混旋器混匀约 15s。
10. 样品在 56℃孵育 30min。
11. 之后，1000*g* 离心 3s，使管中内容物聚到管底。
12. 小心打开每管，加入 200μL 无水乙醇。
13. 每管用涡流混旋器混匀约 15s。1000*g* 离心 3s，使内容物沉淀。
14. 小心将每管的内容物转移到对应标记的 QIAamp®旋转柱中，该离心柱已置于收集管中。
15. 拧紧离心柱的盖子，6000*g* 旋转 1min。
16. 将旋转柱置于干净的收集管中，弃掉含滤液的管子。
17. 小心打开旋转柱的盖子，加入 500μL AW1 缓冲液。
18. 重复步骤 15 和 16。
19. 小心打开旋转柱的盖子，加入 500μL AW2 缓冲液。
20. 拧紧盖子，20 000*g* 离心 3min。

21. AW2 对下游应用有破坏作用，所以建议更换收集管，旋转柱再以 20 000*g* 离心 1min，确保所有的 AW2 缓冲液已弃掉。

22. 将柱子放入对应标记的 1.5mL 离心管中。

23. 打开柱子的盖，加 200μL AE 缓冲液。

24. 56℃孵育 1min，然后 6000*g* 再离心 1min。

25. 每个样品的 DNA 进行定量，如用 Picogreen（Molecular Probes）或 q-PCR 系统。

26. 如果不是马上进行扩增，样品应–20℃冻存。

B. 利用 Promega PowerPlex16 HS（PP16 HS）进行扩增

材料

- Promega PowerPlex16 HS PCR 混合物的成分：混合的 10×引物对，5× Master mix（上样混合液），Promega（这个试剂盒检测所有需要检测的 DNA 标记与 ATCC SDO 标准文件一致，ASN-0002）
- 无菌超纯水（无核酸酶）
- 热循环仪（如 ABI9700，Life Technologies）

操作步骤

1. 从冰箱中取出样品，解冻至室温。
2. 混匀样品并离心。
3. 如果需要，取一部分 DNA 样品稀释至 0.5ng/mL（涡流混旋器混匀约 5s，并短暂离心）。
4. 参照 Promega 步骤，为所有带扩增的样品准备足够混合物。每个样品的混合物包含:
   - 5×上样混合液，1μL
   - 10×混合引物，0.5μL
   - 无菌超纯水，2.5μL
   - 稀释后 DNA 样品或对照（无菌超纯水）1μL 及试剂盒的对照或 K-562（如 ASN-0002 建议的）
5. 每个样品，取 5μL 分别加到 PCR 管中。
6. 把样品放到热循环仪，设定合适的循环程序，开始运行。细节如下：

   （a）96℃ 2min

   （b）94℃ 30s

   （c）60℃ 30s

   （d）70℃ 45s

   （e）重复步骤（a）~（c），10 次

   （f）90℃ 30s

   （g）59℃ 30s

   （h）70℃ 45s

   （i）重复步骤（f）~（h），20 次

   （j）60℃ 30min

   （k）4℃至需要时。

C．利用ABI31XX DNA测序仪进行毛细管电泳

材料

- ABI 31XX DNA 测序仪（Applied Biosystems）或同类仪器（图 13.3）
- 冰或电直冷板（如 CamLab 冰盒）
- 热循环仪（如 ABI9700）
- 光学级微孔板：MicroAmp® 光学 96 孔反应板和封板膜（Life Technologies）
- Hi-Di™ 甲酰胺（Life Technologies）
- 内参标准 600（ILS600，Promega）
- POP-7 聚合物（Life Technologies）
- 跑胶缓冲液：含 EDTA 的 10×缓冲液（Applied Biosystems）

操作步骤

1. 参照技术手册，安装 ABI 31XX DNA 测序仪，准备毛细管电泳。
2. 从冰箱中取出一份分装的甲酰胺，解冻至室温；涡旋混匀 10s。脉冲离心。结束时处理未用的 Hi-Di 甲酰胺。
3. 从冰箱中取出 ILS600，涡旋混匀 10s，脉冲离心。
4. 从冰箱中取出 PP16 HS ladder，涡旋混匀 10s，脉冲离心。
5. 根据将要进行处理的样品数准备足够的甲酰胺/ILS 600 试剂。每个孔准备 10μL Hi-Di 甲酰胺和 0.5μL ILS600，稍有富余以备吸管误差。每次 16 个样品的毛细管电泳应该至少包括一个已知的阳性样品和一个条带标准物。
6. 向 96 孔光学级微孔板的待用孔中加入 11μL 甲酰胺/ILS 600 混合物（每孔）。
7. 向每个相关孔中加入 1μL 扩增的 PCR 产物或等位基因分型标准物。
8. 将光学级微孔板放置于热循环仪上，95℃加热 3min，然后迅速转移至冰盒上或设置在 0℃的电子冷凝块上 3min。
9. 此后，用封板膜密封光学级微孔板，保证橡胶密封圈围绕板的开口。
10. 确保设备中有电泳足够的聚合物，并加满电泳缓冲液。
11. 将装好的微孔板放入自动加样器上，开始电泳。
12. 每次毛细管电泳需要大约 45min。

D．细胞系结果分析

材料

- 基因作图软件（GeneMapper ID®）（Life Technologies）
- 计算机

操作步骤

1. 将保存的电泳结果从 31XX 转移至计算机桌面上。
2. 从文件菜单上，选择“添加样品至程序”，从桌面选择相关的运行文件夹。
3. 点击“添加至列表”，双击文件夹名称打开单独的文件，然后点击“添加”。
4. 样品应该出现在程序的样品窗口，状态栏中每个样品应该有一个绿色三角。

5. 从下拉菜单中选择相关的样品类型，分配至每个样品。一次跑胶只能制订一个标准物作为等位基因分型标准物样品类型。

6. 为本次电泳选择相关的分析、表格、尺寸标准设置。

7. 一旦更新所有设置，点击工具条上的绿色三角，命名，快速保存程序。此后软件将按顺序保存每个样品。

8. 检测每个样品的原始数据和尺寸标准。

9. 查看标准物，以保证样品类型正确指定。

10. 检查阴性对照，除了 ILS600，不应该有染料峰。

11. 检查阳性对照，应包含所有等位基因的检测及适当的类型。

12. 按顺序选择图谱，检查每个图谱，点击关闭不是峰的类型。

13. 用“肖像”模式打印每个文档。

14. 当打印完数据，将程序输出至桌面。

15. 此时可对每个细胞系样品的分析得到的 DNA 谱与已公开的谱进行比较。

短篇综述 13.1 DNA 绘谱及其在细胞系真实性认证中的作用*

细胞真实性认证的总体目的是回答这样一个简单而重要的问题：你所用的培养样品是否来自该样品捐献者？回答该问题的重要性在于两个原因。首先，这是细胞系身份的根本，将培养的样品与其起始捐献者关联。真实性认证满足大家将自己的培养样品与捐献者临床数据及其他取自该捐献者的样品关联，例如，随着捐献者疾病的进展而取的样品。其次，细胞真实性认证使我们免于细胞培养常见且重要的问题——细胞系的错误鉴定。细胞系的交叉污染在 20 世纪 60 年代就发现了（Gartler，1967），直至今日仍是严重的问题（Drexler et al.，2002；Caper-Davis et al.，2010）（参见 13.1.1 节）。错误鉴定的细胞系常常由那些没有意识到这些细胞系已不再与其起源的捐献者关联了的科学家错误使用（Stacey，2000；Masters et al.，2012）。

如何开展真实性认证？基因型与表型比较 通过显微镜下观察形态或者组织特异的标准物的表达，就肯定能区分不同的细胞系吗？为什么不行，有多个原因，包括不同起源的细胞可能表型相似，并且表型在陆续细胞系中可能不稳定（Hughes et al.，2007）。HeLa 细胞有数个亚系形态迥异（Carson and Pirruccello）。永生化的过程中可引起突变及后续亚克隆的选择（Hane et al.，1992）。最终结果是培养物的形态、行为和其他表型特征随着传代而变化（Hughes et al.，2007）。尽管来自另外的培养细胞的交叉污染还可能导致进一步的表型变化，但实践中这些表型的变化常常被忽略了。

SH-SY5Y 这个细胞系（Biedler et al.，1978）体现了表型特征（认证）的缺点。这个广泛使用的神经元模型，向培养液中添加不同的诱导分化剂，可诱导出不同的表型。培养的 SH-SY5Y 细胞中有贴壁亚群和悬浮亚群，悬浮细胞更易向神经元样细胞分化（Kovalecich and Langford，2013）。依赖于血清及诱导分化剂存在与否，培养的细胞可呈现不同的形态及表型特征（Encinas et al.，2000）。当然，如果交叉污染发生了，培养的细胞看起来也就不同了。文献中有个例子，随意的培养细胞标记为 SH-SY5Y，其实是小鼠细胞（Jiang and Wang，2014），污染后的细胞是

* 由国际细胞系鉴定委员会（ICLAC）的 Amanda Capes-Davisa（capdav@gmail.com）提供。

贴壁的，没有悬浮的细胞群了，这种变化的意义直到（真实性）检测时才意识到。

从同一个个体来源的所有样品应该有抑制的基因型。不同样品间，基因型不同。因为从恶性肿瘤组织建立了许多培养细胞，即使原代培养细胞中，也可能存在变异。有些培养的细胞可能有微卫星不稳定性或者其他突变，由此随时间的变化会改变基因型标准（Parson et al.，2005；Abaan et al.，2013）。任何以基因型为基础的真实性检测必须能够区分不同个体，同时允许区分培养细胞中可能发生的基因型变化。

真实性认证目前的实践 早间关于细胞系交叉污染的工作依赖同工酶和细胞遗传学分析（Gartler，1967），而且出奇得成功，用这两种方法 Walter Nelson-Ress 发现了 80 多个错误的细胞系（Capes-Davis et al.，2010）。然而，同工酶分析用于种属鉴定，无法区分不同的个体（Nims et al.，2010）。细胞遗传学分析需要特殊的实验技能（Macleod et al.，2011）。两种方法都需大量人力，急需新方法检查世界各地实验室建立的不断增加的细胞系。

1984 年可以进行脱氧核糖核酸绘谱了，那年 Alec Jeffreys 发现可以用回文重复 DNA 序列建立“DNA 指纹”用以区分不同个体（Jeffreys，2013）。Jeffreys 的发现很快用于制作法庭上法律认可的科学证据。法医科学家发现，为使结果可重复，需要人群的数据来证明选取位点的有效性，并建立质量标准及结果解释（Lander and Budowle，1994）。有质量控制的商业试剂盒已研发出来了，包含由人群数据抽取的对照及位点梯度，有助于变异度（Butler，2011）。

细胞真实性认证领域从这些教训中获益，将其用于培养细胞（真实性认证领域）。短回文重复（STR）位点，特别是基因组中发现的 4 核苷酸或 5 核苷酸重复序列，可以很快地并且可靠地区分来自不同捐献者的培养细胞，同时允许从同一捐献者来源的培养细胞中的基因漂移（Tanabe et al.，1999；Masters et al.，2001）。图 13.2 显示 STR 绘谱实际是如何工作的。人类细胞系真实性认证的标准已经发表，推荐 STR 绘谱应用于人类细胞真实性认证（ANSI/ATCC ASN-0002- 2011）。

如何解释？让 STR 谱有意义 制作 STR 谱的方法可以不同，如有的实验室提取 DNA，而其他实验室将他们的细胞点样到 FTA 卡（Whatman, GE 生命科学）上，室温保存，取一部分进行 PCR（McLaren et al.，2013）。本书将制作 STR 谱的步骤（参见实验程序 13.1）作为例子，显示关键步骤及这些步骤如何实际操作。一个实验室中，不管用什么方法，必须进行有效性验证，以评估那个实验室的可靠性。真实性认证还可以解决诸如检测混合细胞的能力等重要问题，在交叉污染的早期常见。

实验工作完成后，你就有了 STR 谱。怎么解释那个结果？人类细胞真实性认证标准中有很好的解释指南（ANSI/ATCC ASN-0002-2011）。表 13.3 回答了关于 STR 谱解释的 5 个基本问题。

表 13.3 STR 谱的解释

问题	参考文献
你做的 STR 谱达到质量标准了吗？	Butler，2011；ANSI/ATCC ASN-0002-2011
你做的 STR 谱包含了细胞系比较用的核心位点了吗？	ANSI/ATCC ASN-0002-2011
应该用什么样的标准样品进行比较？	ANSI/ATCC ASN-0002-2011；Capes-Davis et al.，2013a
样品与参照样品比对后符合的百分比是多少？	Musgrave-Brown et al.，2007；Demichelis et al.，2008
符合百分比数值的含义是什么？	ANSI/ATCC ASN-0002-2011；Barallon et al.，2010

第一个需要回答的问题是你的 STR 谱是否达到质量标准。每次实验必须包含阳性对照和阴性对照。STR 谱可能出现与仪器及那次实验的条件，或者所用 DNA 的质量和数量相关的假象。STR 谱中的假象，在法医领域都知道，在别处有详细表述（ANSI/ATCC ASN-0002-2011；Butler，2011）。用于 STR 谱解释的软件可以设定分析阈值，以排除哪项假象，便于进一步分析。每个制作 STR 谱的实验室必须评估其对照并在接受结果前查看假象。如果必要，样品应该重复测定，直到达到质量标准。

为使结果有意义，STR 位点数有个最低数，人类细胞系真实性认证的标准是 8 个 STR 位点，作为细胞系真实性认证的核心位点。这些位点是 D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、vWA、TH01、TPOX 和 CSF1PO。加上第九个标记，amelogenin，测定性别。大家必须有这套 STR 核心位点以便能与其他实验室的结果进行比对（ANSI/ATCC ASN-0002-2011）。在核心位点基础上添加更多 STR 位点可提高区分的水平、降低假象符合的可能性（Bady et al.，2012）。现在大多数 STR 绘谱试剂盒包含更多位点，这一点对于分析微卫星不稳定的细胞系特别有帮助，这些细胞系易于随着细胞传代而发生遗传漂移（Parson et al.，2005）。

必须要有一个或多个参照样品进行比对。参照样品最好的选择是来自同一个捐献者的 STR 谱。从捐献者来源的组织没有，无法制作 STR 谱，可利用网上在线 STR 谱的数据库，库中包含来自不同细胞系的参照物（Dirks et al.，2010）。交叉污染常常涉及经典的肿瘤细胞系，如 HeLa, 因此有许许多多这样的细胞系的 STR 谱构成的数据库，排除交叉污染是有效的工具（Macleod et al.，1999）。

等这些问题都搞清楚了，人们就可以开始比对自己的样品与合适的参照品。符合百分比作为比对的计算方法（Capes-Davis et al.，2013a；Lorenzi et al.，2009）。通常算法要求计算每个基因座位上位点的总数，待测及参照样品双方相同位点的数量。ICLAC 制作了工作单，帮助大家将自己的 STR 谱与一个个参照谱进行比对（ICLAC, 2015；Match Criteria Worksheet）。在线数据库允许大家搜索比对多个 STR 谱，并且列出符合百分比最高的结果（ATCC 和 DSMZ 数据库）。

第五个，也是最后的一个问题，符合百分比数值意味着什么？科学家一般应用一套符合百分比规则，来决定 2 个样品是否来自同一个捐献者。这些符合百分比规则是基于多个样品的分析，实际工作中最好用，而且依赖比对位点的数量及符合率的算法，也许会变化。泛泛地讲，80%以上的符合百分比值可解释为这些样品来自同一个捐献者。而符合百分比值小于 55%提示样品来自不同的捐献者。符合百分比值在 55%~80%是无法确定的，意味着无法得出肯定结论，还需要进一步分析（ANSI/ATCC ASN-0002-2011）。进一步分析可能涉及增加 STR 位点数量，提供更多的区分度，或者进行细胞遗传学分析，寻找细胞系特异的标记（Macleod et al.，2011）。

真实性认证的未来趋势 尽管 STR 绘谱是高效的，对科学家来说，在自己的实验室进行检测可能很困难。STR 分析是基于片段长度，需要与对照和位点梯度进行精确的比对。诸如单核苷酸多态性（SNP）分析（Liang-Chu et al.，2015）这样以序列为基础的技术的发明，使在基因组分析领域有经验的科学家可将真实性认证整合到他们的实验工作中（COSMIC Cell Line Project）。SNP 分析也是有效的区分个体的途径（Musgrave-Brown et al.，2007），而且该技术可检测随着传代而来的基因漂移（Demichelis et al.，2008；Castro et al.，2012）。令人兴奋的是，SNP 和 STR 分析都可延伸到对非人类细胞系的个体或小鼠品系的区分（Almeida et al.，2014；Didion et al.，2014）。这将提高非人类细胞系的真实性检测，这些细胞系主要依靠种属鉴定手段检测交叉污染（Cooper et al.，2007）。

真实性检测领域将继续采用新的检测策略。但是保留历史数据及不丢失与已有数据的联系是非常重要的（Masters et al.，2001）。人类细胞系的交叉污染最早在 20 世纪 60 年代检测到（Gartler，1967）。使用细胞系工作的科学家需要有长期记忆及跨时空的与其他样品比对的能力。

结论 真实性检测帮助确保细胞培养工作的可靠及可重复。利用 STR 分析进行 DNA 绘谱、或者诸如 SNP 分析等的新兴技术用于证明一个样品出自期望的捐献者，或者换言之，样品没有与其他细胞系交叉污染。也许最大的挑战是如何将真实性检测融入日常培养实践中（ICLAC, 2015；Advice to Scientists）。将真实性检测包含在实验计划中永远是最好的，例如，原代培养时，将捐献组织另存一点，就有了那个个体的参照品。细胞系的真实性认证是建立细胞系身份和身世所必需的，如此方能使其成为未来科学家有价值的资源。

13.1.6 通过DNA条码测定动物细胞的种属

DNA图谱已经广泛用于人源细胞系，其引物非常常用（图13.3），但是扩展至其他动物种属上还有一定的限制。可以使用细胞色素氧化酶I基因所谓的“条形码区域”（方案13.2）（Cooper et al., 2007）来进行物种分析，也可通过染色体（参见13.1.8节）或同工酶分析（参见13.1.7节）。

方案13.2 动物细胞 *CO1* 条码制作

方案由G. R. Sykes提供，ATCC，10801，University Boulevard，Manassaa, VA 20110 USA。gsykes@atcc.org

背景

细胞系身份认证包括培养物假定种属的确认，然而许多普通实验室检查检测其他形式的生物污染。例如，种属内身份检定，如人类STR的分析（参见13.1.5节），可区分来自不同供体的细胞系。尽管STR提供了可靠有力的识别人类材料的手段，却不能进行种属间的身份确认。如果人源培养物主要由另一种动物交叉污染，STR电泳图可呈现峰值降低，而完全丢失污染种属DNA的信息。同工酶分析（参见13.1.7节）一直用于种属间的确定，但是工作烦琐、注释错误，对于非哺乳类材料成功率变化不定。因此需要简单而有效的手段以确定动物种属及种属间的错误鉴定。

有一种称为DNA条码的种属检定的方法，通过检查少量、特异DNA片段而实现（Hebert et al., 2003）。利用这一技术，基因组中的保守序列经扩增，然后与其他一种种属的相应序列进行比对。与哪个种属最接近，那么是该种属的可能性就最高。对动物细胞系来说，分析细胞色素氧化酶亚单位1基因（*CO1*）也是可靠的种属鉴定。这一个半保守的线粒体区域没有内含子，是母系遗传，在动物群体中通常没有明显变异，但种属间不同。更没有线粒体DNA重组事件罕见。待定序列的数据与可随意访问的专业公共生命数据库（Barcode of Life）中成千种高质量的*CO1*标准序列进行比对。

尽管*CO1*条码分析是细胞系真实性认证的有力工具，也有些限制。确定过程需要Sanger法测序，识别最接近的碱基信号，两种动物DNA均匀混合的样品可能会产生非常无序的信号而无法解析。还有，低水平的交叉污染不易引起注意，会漏掉，解决方法是用常用实验动物[小鼠、大鼠、兔等（Cooper et al., 2007)]的特异引物进行PCR，可检测至少1%的污染。对于杂交动物、多种属杂交瘤、转基因细胞、核移植及其他形式的基因操作，*CO1*条码只反映母本的染色体起源，不必是细胞内全部的遗传起源。另外，*CO1*条码分析只瞄准动物DNA，揭示微生物污染还需要其他检测技术（参见14.3节）。本方案的几乎通用的引物序列可检测成千的动物种属。然而，对有些动物种群来说，也许需要进行引物优化。大多数种属的*CO1*条码有很小的变异，也可能有例外。最后，应该清楚分类混乱的情况——种属可以重新分类并且更新命名，导致同一物种可有历史名字及当前的名字。

概要

首先，纯化动物细胞的DNA，用*CO1*条码引物扩增。扩增产物鉴定、纯化并测序。然后将样品上样到基因分析仪，并分析数据。

A. DNA 制备

注意：许多基因组 DNA 纯化程序都适用于 *CO1* 条码分析，商业的试剂盒、内部的强力抽提方法都行。多种 DNA 定量方法都可用（例如，测吸光值、PicoGreen®分析，见 23.3 节）。一个实验室自建的程序也可用于获得纯度在 10~300μg/μL 的 DNA（详细步骤见方案 13.1）。以下的步骤描述一种 DNA 制备方法，用 FTA™ 卡。

材料

- D-PBS, pH 7.4
- 带滤膜的微量加样枪，无菌头
- 旋涡混悬器
- FTA 卡：Whatman 指示 FTA™ 卡（GE Life Sciences）
- Harris 打孔器,1.2mm（GE Life Sciences）
- PCR 管，200μL（Eppendorf）
- 离心管，0.65~2.0mL（Eppendorf）
- 试管架
- Whatman FTA™ 纯化试剂（GE Life Sciences）
- TE：Tris-HCl, 10mmol/L，含 0.1nmol/L EDTA，pH 8.0

操作步骤

最佳细胞团是 20μL 浓度为 1×10^6/mL。少于 2×10^4 个细胞，可能有数据，但信号强度低。

1. 生物安全柜中，收集 30 000~5 000 000 个细胞的细胞团（参见 12.5 节）。
2. 用 D-PBSA 重悬细胞团，D-PBSA 用量（μL）=细胞总数÷10^3。
3. 将所需量的 D-PBSA 加到细胞团中，旋涡混匀。
4. 取 20μL 细胞悬液加到预先标记的 FTA 卡上，空气干燥形成斑点。样品室温下至少 10 年内稳定（Fomovskaia et al.，2004；GE Healthcare，2009）。
5. PCR 之前，用 1.2mm 的打孔器，取斑点的中心部分，转到标记好的 200μL PCR 管中。阳性对照也可是以前认证过的生物安全 I 级（参见 6.8.1 节）的细胞斑点。任意 FTA 卡的部分不加模板，做空白对照。
6. 向 PCR 管中加 190μL FTA™ 纯化试剂，室温孵育 5min。
7. 用 200μL 的加样器小心移除液体。
8. 重复步骤 6 和 7。
9. 向每管中加 190μL TE 液，室温孵育 5min。
10. 用 200μL 的加样器移除所有的 TE 液。
11. 在管中原位空气干燥斑点片，干燥过程中注意不要因为气流或静电而丢失样品。这时可进行 PCR 或–20℃保存数周。

B. CO1 条码扩增和检测

材料

- 设施：PCR 前和 PCR 后实验室（参见附录 II）
- 样品：液态 DNA（标化至 5ng/μL）或 FTA™ 打孔而来的样品。

- 来自身份已认证过的细胞系的阳性对照，涉及以下种群，建议：
  - ❖ 哺乳类：SITC（Statens Seruminstitut Rabbit Cornea）（ATCC® CCL-60™）——*Oryctolagus cuniculus*（兔）。
  - ❖ 昆虫：Sf9（ATCC® CRL-1711™）——*Spodoptera frugiperda*（秋季军队虫）。
  - ❖ 鱼类：SJD.1（ATCC® CRL-2296™）——*Danio rerio*（斑马鱼）。
  - ❖ 两栖类：A6（ATCC® CCL-102™）——*Xenopus laevie*（南非爪蟾）。
  - ❖ 爬行类：Gekko lung-1（ATCC® CCL-111™）——*Gekko gecko*（守宫）。
- PCR 管，200μL
- 离心管，0.65~2.0mL（Eppendorf）
- 试管架
- 带滤膜的微量加样枪，无菌头
- 分子生物级水：UPW
- 引物，10μmol/L（改良自 Ivanova et al.，2007）：

引物名称	引物序列（划线部分是 M13 尾）
VF1d_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG
VR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA
LepF1_t1_	TGTAAAACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
LepR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA

注意：这一引物混合物对多个种属有效。多特殊的种属族群有些引物序列及 PCR 条件需要优化。

- PCR 缓冲液，10×（与 HotStart *Taq* DNA 聚合酶一起提供）
- $MgCl_2$, 50mmol/L
- dNTP,10nmol/L
- HotStart *Taq* DNA 聚合酶，5U/μL（Life Technologies）
- 旋涡混悬器
- 小离心机
- 热循环仪（如 Bio-Rad）
- 预制琼脂糖胶和电泳槽：E-Gel®和 iBase™（2%，双排梳子，SYBR® safe 或溴化乙锭，Life Technologies）

▲安全提示 溴化乙锭是诱变剂和可疑致癌物。

- 透光仪和照相机（如 BioRad Gel Doc XR+）

操作步骤

1. 确定样品及对照总数。为补偿加样误差，把样本数×1.05，得出最近的整数，作“纠正因子”。
2. 在 PCR 前实验室，取每种引物 100μL，在干净、做好标记的离心管中混匀。
3. 根据下表准备“主混合物”“主混合物体积”是“纠正因子”和“1×反应体积”的乘积。

试剂	1×反应体积（μL）	纠正因子	主混合物体积
UPW	19.15[a]		
10×PCR 缓冲液	2.5		
50mmol/L $MgCl_2$	1.25		
10mmol/L dNTP	0.5		

续表

试剂	1×反应体积（μL）	纠正因子	主混合物体积
10μmol/L 引物混合物	0.5		
HotStart *Taq*	0.1		
总体积	24.0*		

a 对 FTA™ 样品而言，水的体积是 20.15μL；终反应体积是 25.0μL

4. 解冻、混匀、短时离心 PCR 试剂。
5. 把主混合物都加到小离心管中、混匀、短时离心。
6. 加主混合物和样品

（a）液体 DNA 样品：取 24μL 主混合物加到标记好的 200μL 离心管中，然后加 1μL 样品、阳性对照 DNA 或无模板的水对照。

（b）FTA™ 样品：取 25μL 主混合物加到标记好的 200μL 离心管中，其中已含洗过的 FTA™ 打孔片。

7. 密封，混匀，短时离心。
8. 将这些离心管带到 PCR 后实验室，放到热循环仪中。
9. 用下述程序跑 PCR:

循环数	温度	时间
1×	94℃	1min
	94℃	30s
5×	50℃	40s
	72℃	1min
	94℃	30s
35×	54℃	40s
	72℃	1min
1×	72℃	10min
1×	4℃	保持

10. 完成后，将离心管置离心管架上。
11. 将预制胶 E-Gel®插入 iBase™ 电泳槽中。
12. 在标准栏中加 100bp 梯度标记。
13. 在合适的孔中加 10μL PCR 扩增产物（样品的 PCR 产物，见附录 II）。
14. 跑 E-Gel®胶 13min。
15. 用正确的滤光片，在透光仪上观察 SYBR® safe 或溴化乙锭染色的凝胶，照相。然后恰当处理凝胶。
16. 将在约 750bp（碱基对）条带的样品管挑出来放在一边，做后续纯化。

C. 扩增物纯化

注意：有不同的扩增物纯化步骤，有些简单而有效，含酶解（ExoSAP-IT, Affymtrix）和纯化柱（QIAquick® PCR 纯化试剂盒，QIAGEN）技术。选择一种方法并按照制造商的步骤操作，或用贵实验室已建立的纯化步骤。纯化的样品–20℃储存。

D. CO1 条码测序

试剂和材料

- BigDye® Terminator v3.1 循环测序盒（Life Technologies）

- 可选：HalfBD® v3.1, ABI BigDye® v3.1（Molecular Device）
- 冰桶
- 引物，10μmol/L

引物名称	引物序列
通用 M13F（21）	TGTAAAACGACGGCCAGT
通用 M13R（27）	CAGGAAACAGCTATGAC

- 微孔板，96孔及板封
- 微量加样器和（或）多道加样器及滤膜，无菌头
- 小离心管，0.65~2.0mL
- 离心管架
- 旋涡混悬器
- 大离心机（如 Eppendorf 5810R），带孔板提篮
- 热循环仪（如 Bio-Rad）

操作步骤

1. 制作孔板地图，确定96孔板中每个孔的反应（图13.4）。

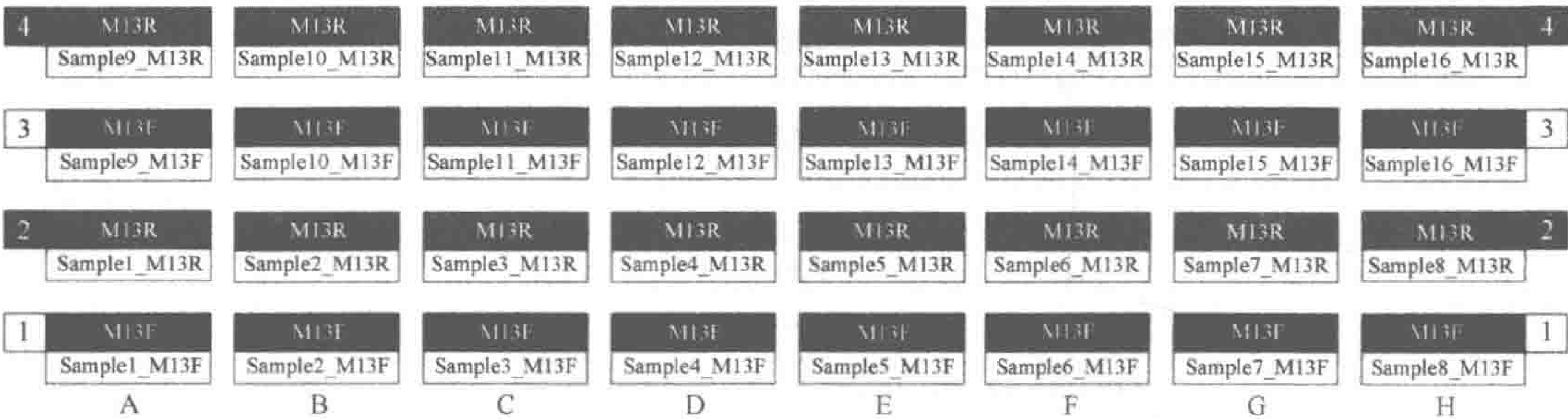


图 13.4 DNA 条形码制作的孔板地图

2. 确定总反应数，包含测序对照（如 pGEM®），为补偿加样误差，把样本数×1.125（比PCR高，因为体积更小，溶液更黏），得出最近的整数，作“纠正因子”。

3. 计算每个测序引物多项的测序主混合物，测序是单向的，绝不能把正向引物（M13F）与反向引物（M13R）在同一管中混合。“主混合物体积”是“纠正因子”和“1×反应体积”的乘积。

试剂	1×反应体积（μL）	纠正因子	主混合物体积
BigDye® v3.1 混合物	4.0		
引物	1.0		
总体积	5.0		

4. 在PCR后于实验室中，解冻、混匀、短时离心上述试剂。

可选：解冻。在2mL离心管中混合400μL BigDye® Terminator v3.1 和1.2mL ABI BigDye® v3.1。否则单用 BigDye® Terminator v3.1。BigDye® 保持在冰上。

5. 把主混合物都加到另一个小离心管中，混匀、短时离心。

6. 取5μL主混合物加到96孔板合适的孔中。

7. 加5μL扩增物做模板到96孔板合适的孔中。

8. 密封，混匀孔板。

9. 在大离心机中以400g短时离心孔板，将液滴甩到底部。

10. 将孔板放到热循环仪中。用下述程序跑测序反应：

循环数	温度	时间
1×	96℃	1min
	96℃	10s
25×	50℃	5s
	60℃	4min
1×	4℃	保持

11. 完成后，纯化样品。

E. 纯化和毛细管电泳

试剂和材料

- 大离心机（如Eppendorf 5810R），带孔板提篮
- 微孔板，96孔，平底
- Performa® DTR 超级96孔板（Edge BioSystems）
- 微量加样器和（或）多道加样器及滤膜，无菌头
- MicroAmp®光学96孔反应板（Life Technologies）
- 96孔板封隔膜（Life Technologies）
- ABI3500×L基因分析仪（Applied Biosystems）或同等仪器
- 与基因分析仪一起用的物品（与分析仪同一供应商）：
    - ❖ 毛细管束，50cm
    - ❖ POP-7聚合体
    - ❖ 电泳缓冲液
    - ❖ 孔板卡座

操作步骤

1. 用Performa® DTR 超级96孔板，按照制造商的指导操作。将纯化样品收集到MicroAmp®光学96孔反应板（MicroAmp® Plate）。

2. 然后，用96孔板封隔膜封盖MicroAmp®孔板中的样品。

3. 安装基因分析仪卡座和MicroAmp®孔板。

4. 将已安装了孔板的卡座放到基因分析仪中，设定时间和电压，以便至少可收获700个碱基，启动运行。

F. 序列分析

材料

- 密码子编码比对排列软件（CodonCode）或相当的DNA序列分析软件

- 可上网的计算机

操作步骤

1. 将电泳图（.abl 格式的文件）转到分析用计算机。
2. 密码子编码比对排列软件，菜单中点击“文档”，选择“导入”，然后从收集到数据中“添加样品”。
3. 选定（高亮）样品并修剪掉末端序列。反应失效的文件，移到垃圾箱。
4. 确认对照的序列质量高。
5. 选定样品的正向和反向。在菜单“Contig”中，选择“Assemble 组装”。
6. 把新的“Contig”以样品名重新命名。打开该 Contig 文档，剪掉还有的低质量的末端序列。如果正向引物序列从右到左读，按下［Ctrl］+R 键，读反向序列。

   对大多数靠谱的分析而言，序列含 500bp 以上，质量分数大于 20。
7. 重复步骤 5 和 6，完成所有样品的分析。
8. 选定所有的 Contig 文档。在文档菜单中，选择“导出”，然后点击“通用序列”（或对于只有一种序列的样品点击“样品”），作为每个样品的一个 FASTA 格式的文件。
9. 打开任一 FASTA 格式的文件（FASTA_All——编码核苷酸和氨基酸的单个字母），复制其中的内容。
10. 到生命数据编码系统（BOLD 系统）的网站上进行数据比对。
11. 在搜索栏选择要查询的数据库。不同选项确保参照样品的严谨性。将 FASTA 的信息粘贴到“以 FASTA 格式录入序列”框中，点击提交。
12. 新屏将提供可能性最高的种属。依靠最初查询的数据库，显示的选项也许会包含与参照样品的匹配数，比邻树，以及利用条码指数表示的匹配最近的数据簇。到 BOLD 系统的网站查看大多数目前的选择。
13. 重复步骤 11 和 12，完成所有样品。

13.1.7 同工酶分析

根据酶蛋白在不同物种、不同种族、不同个体或同一物种的不同组织中的多态性，可在不同细胞株间进行酶活性定性比较。这些所谓的多态性，称为同工酶，可用层析法或电泳法分离，其分布样式（酶谱）是物种或组织特异的（图 13.5，方案 13.3）。Nims 等（1998）研究认为，如果污染细胞数量至少占总数的 10%，同工酶分析可以检测出物种间细胞系的交叉污染。

历史上，同工酶分析层数细胞是种属起源认定的主要标准之一。然而，随着更快更准确又较便宜的以基因为基础的种属鉴定方法（参见方案 13.2）的发明，同工酶分析会渐渐失宠，试剂也变得难找来源。

电泳介质包括琼脂糖、乙酸纤维素、淀粉和聚丙烯酰胺。在每种情况下，酶的粗提物点样于凝胶上，在凝胶两端加压。不同的同工酶迁移速率不同，随后用带色底物染色可检测出来，凝胶染色后，可直接通过肉眼、拍照或光密度计扫描读出。

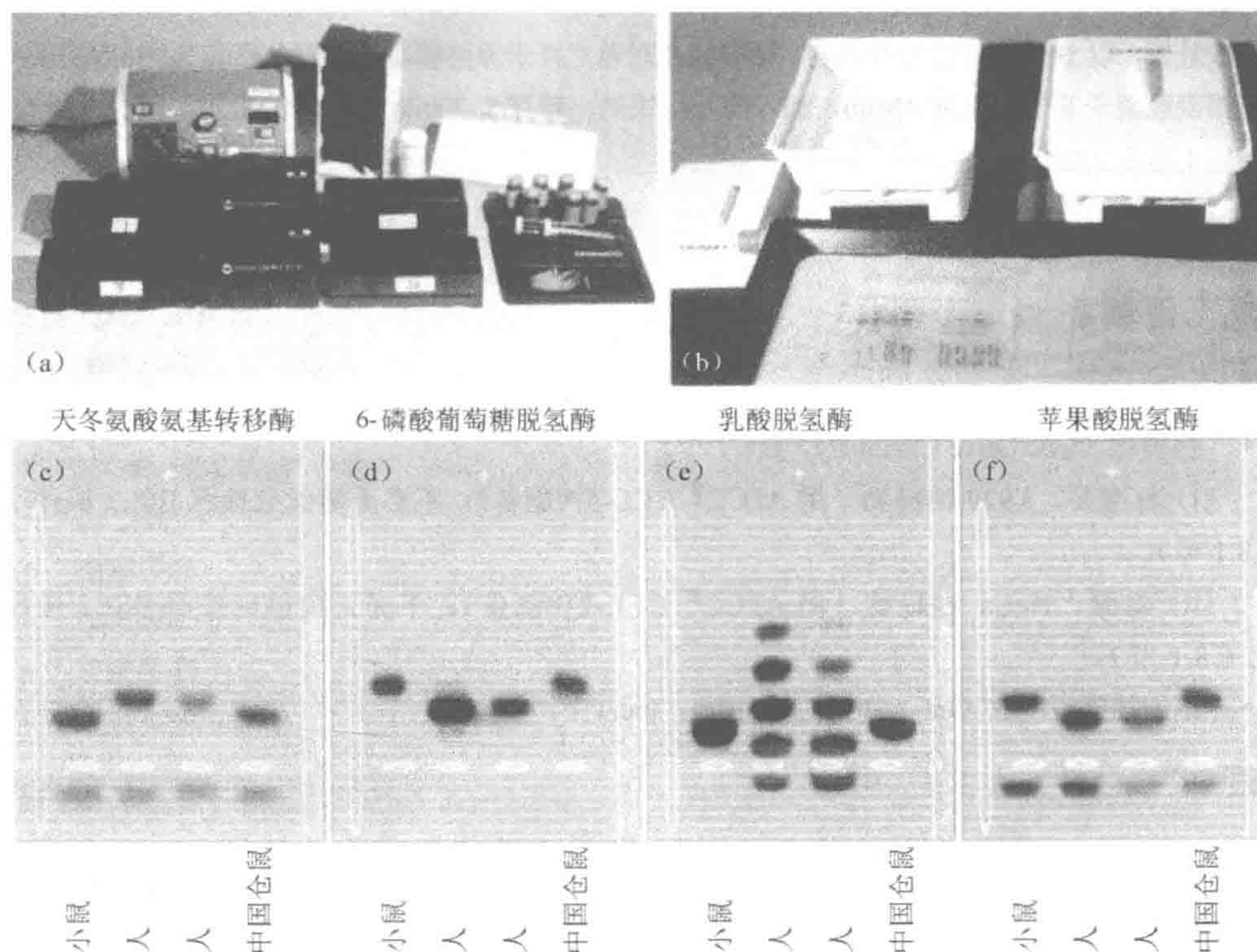


图 13.5 同工酶电泳。利用 Authentik（Innovative Chemistry）的凝胶电泳系统分析 4 种同工酶；（a）4 个盒的装置，电源在后面，试剂在右侧，3 块预制胶在前面；（b）染色和清洗托盘（Corning），前面是显色后的胶；（c）~（f）从显色后电子图获得的图像（图片和电子图由 ATCC 授权使用）

方案 13.3 同工酶分析

由 Jane L. Caputo 和 Yvonne Reid 提供。美国模式培养物收集中心（ATCC），10801 University Blvd.，Manassas，Virginia 20110，USA.YREID@atcc.org

背景：利用 Authentikit 进行同工酶电泳

细胞系的物种起源可以用 Authentikit 凝胶电泳系统确定，该系统可用于测定 7 种同工酶的迁移率：核苷磷酸化酶（NP；E.C. 2.4.2.1）；葡萄糖 6-磷酸脱氢酶（G6PD；E.C. 1.1.1.49）；苹果酸脱氢酶（MD；E.C. 1.1.1.37）；乳酸脱氢酶（LD；E.C.1.1.1.27）；天冬氨酸氨基转移酶（AST；E.C. 2.6.1.1）；甘露糖 6-磷酸异构酶（MPI；E.C. 5.3.1.8）；肽酶 B（PepB；E.C. 3.4.11.4）。这个系统每块凝胶中在 3h 内就可很容易地检测 6 种细胞系的 7 种遗传标记物（Hay，2000）。在多数情况下，起源物种可用所列 7 种同工酶中的 4 种来确定：核苷磷酸化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、苹果酸脱氢酶和乳酸脱氢酶。同样，物种间细胞系的交叉污染在大多数情况下也用这 4 种同工酶检测（Nims et al.，1998），当然分析小鼠细胞系被仓鼠细胞系污染时也需要肽酶 B。

概要

收集细胞，用 D-PBS 洗涤，重新制成 5×10^7 个/mL 的细胞悬液，制备细胞抽提物并置于–70℃保存。

准备凝胶装置，取1~2μL的细胞抽提物、标准品及对照点样于琼脂糖凝胶。槽内充满SAB8.6的缓冲液，将琼脂糖凝胶置于其中，电泳25min，加入酶反应试剂，孵育5~20min后，冲洗凝胶，干燥，检查已完成的凝胶中显示的酶区带。

材料

无菌或无菌制备

- 细胞
- 抽提物（Innovative Chemistry，Inc.）

  （i）标准品，L929抽提物（用ATCC® CCL-1™制备），不必无菌但应按照BSL2操作（参见6.8.1节）。

  （ii）对照，HeLa 抽提物（用ATCC® CCL-2™制备），不必无菌但应按照BSL2操作（参见6.8.1节）。
- 细胞抽提缓冲液（Innovative Chemistry，Inc.）

非无菌

- Authentikit装置和试剂（均来自Innovative Chemistry，Inc.）
- 琼脂糖凝胶，SAB8.6，每种酶的检测使用一块
- 孵育盘衬垫，每种酶的检测使用一个
- 孵育盘
- 染色或洗涤盘
- 温度控制室的槽盖和槽底
- 定时电泳仪（160V DC）
- 安全连接器
- 孵育室或干燥器
- 配有1in长磁力棒的磁力搅拌器
- 缓冲液，SAB8.6
- 酶稳定改良试剂（货号R578，10mL；货号R-590，5mL）
- 1×Triton（ATCC®，货号MD-80220-TB）
- 酶底物，每种一瓶

  （i）核苷酸磷酸化酶（NP）

  （ii）6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PD）

  （iii）苹果酸脱氢酶（MD）

  （iv）乳酸脱氢酶（LD）

  （v）天冬氨酸氨基转移酶（AST）

  （vi）6-磷酸甘露糖异构酶（MPI）

  （vii）肽酶B（Pep B）
- 样品加样器Teflon tips®
- 凝胶记录表
- 酶迁移数据表
- 细胞I.D. 最终分析表

- 微升注射器

附加仪器及试剂

- 微量离心机
- 1.5mL Eppendorf 管
- 1.0mL 加样器
- 加样器吸头
- 5.0mL 移液管
- 100mL 刻度量筒
- 记号笔
- 去离子水
- D-PBSA
- 防护手套
- 装吸头的垃圾桶

操作步骤

A. 抽提物的制备

1. 按常规方法培养细胞至少达 5×10^6 个活细胞。
2. 依照具体细胞系实验推荐的方法收集细胞。
3. 细胞团重悬于 D-PBSA 中，计数活细胞。
4. 细胞悬液以 300*g* 离心 5~10min 沉淀细胞，倾去上清液。
5. 重复步骤 3 和 4，总共洗涤细胞 3 次。
6. 加入 12.5μL 的 D-PBSA（用于 5×10^6 个活细胞）。
7. 涡旋细胞收集管 1~2s，直到细胞团块分散。
8. 向细胞悬液中加入 12.5μL 2×Triton-EDTA。
9. 用移液管轻柔地上下吹吸以破坏细胞，不可涡旋。
10. 4℃最高速快速离心（microfuge）2min。
11. 向提取物/裂解液中加入等量的酶稳定剂。
12. 通过轻柔抽吸混合裂解液，不可涡旋。
13. 将抽提物等分为所需体积，–70℃保存。

B. 安装电泳仪

1. 打开孵育箱电源。
2. 每个孵育盘内放一个盘垫。
3. 在每个孵育盘中加入 6.0mL 去离子水，37℃保温 20min。
4. 向电泳槽每个盘室中加入 95mL SAB8.6 缓冲液（整个电泳槽中缓冲液的总体积为 190mL）。该缓冲液不可重复使用，因为电泳过程中 pH 会有显著改变。
5. 将装了缓冲液的电泳槽通过安全连接线与电压可调的电源连接，电源接地。
6. 将每个温控电泳室盖表面充满 500mL 冷水（4~10℃）。电泳盖一定要在垂直放置时装满水，否则水将流失。用冰将水冷却或在冰箱中储备足够的冷水，每次电泳前要更换冷水。

7．每个染色盘中放500mL去离子水或蒸馏水，并用它洗涤孵育盘。这些水不能重复使用。

C．电泳步骤

1．电泳前再从冷室中取出琼脂糖凝胶，仔细标记每块待用琼脂糖凝胶。可用Innovative Chemistry，Inc.的标签或用永久性记号笔在凝胶背面做个记号。

2．将凝胶放在台面上，塑料突起向下。调整凝胶方向使样品孔离操作者最近。操作琼脂糖凝胶时戴手套。

3．标记每个样品孔，标明将被检测的样品（如标准、对照、未知1、未知2等）。每块凝胶可检测6个未知样品。

4．将琼脂糖凝胶从坚硬的塑料支持物上小心地剥离。沿着边缘小心处理凝胶，弃去硬塑料支持物。

5．向样品孔加入细胞抽提物。用装有Teflon头的分液器将1μL细胞抽提物精确地加到每个孔中。每个样品用一个新的头。将标准品点样于泳道1，对照点样于泳道2，未知点样于泳道3~8。为避免损伤琼脂糖，只有细胞抽提液滴可接触样孔，点样器尖不能碰孔。若点样量为2μL，在第一个1μL样品散到琼脂糖内后再点第2滴。

6．将每个已点样的琼脂糖胶插入电泳槽盖上，琼脂糖面向外。将琼脂糖胶的阳极（+）与电泳槽盖的阳极（+）匹配，可能需将琼脂糖凝胶轻微弯曲以便插入电泳槽盖。

7．在每个电泳槽座上放一个电泳槽盖。内部有磁铁的黑端最靠近电源。打开电源（160V），定时25min。

8．在电泳结束前大约5min时，从冰箱中拿出每个底物试剂瓶，使其恢复到室温。

9．临用前加入0.5~1mL去离子水至每个试剂瓶中，轻轻地旋转小瓶使试剂溶解。

10．电泳结束时，从电泳槽座上拿开电泳槽盖并将其置于吸水纸上。

D．染色步骤

1．从电泳槽室上取出琼脂糖胶，抓住凝胶膜边缘，向内轻压便可将其从盖中取出。

2．将琼脂糖凝胶侧立，置于水平放在平面上的吸水纸上，点样孔朝向操作者。

3．仔细地用不起毛的吸纸吸去琼脂糖胶两端残余的缓冲液。

4．沿着琼脂糖凝胶膜底边放置一支5mL的移液管。

5．沿着移液管的前缘将重新制备的底物均匀倾倒于琼脂糖胶上。

6．用平滑的动作推动吸管经过琼脂糖表面，一次完成，再向操作者方向拖回吸管，在琼脂糖表面推多次，吸管滚动着离开琼脂糖末端，在此过程中移去多余的物质，注意不要破坏琼脂糖，此步无需加压。

7．将边缘整齐的琼脂糖凝胶放在预热的孵育器盘中，琼脂糖面向上，并把盘置于37℃孵箱内5~20min。

8．为了测量迁移距离的分辨率，当凝胶上的条带具有最佳密度时，就应当终止孵育。不要使条带过度染色，这对准确测定迁移距离可能产生不利。

9．孵育后，用500mL双蒸水或去离子水清洗琼脂糖凝胶两次，用磁力搅拌棒搅动，每次15min，第一个15min后，取出每个凝胶膜，将水弃去，加入500mL新鲜水于器皿中，将凝胶膜浸入水中，并予以遮盖避光，确保薄膜完全浸入而不是漂浮在清洗液上。

10．从水中取回凝胶膜，将其放置于孵箱或烤箱烘干室的烘干架内，烘干30min或直到琼脂糖胶干燥，也可将琼脂糖凝胶室温干燥过夜。

11. 清洁整理，倒掉电泳槽底缓冲液，并用蒸馏水冲洗，将电泳槽盖中的水倒出，冲洗槽盖内部并晾干。

12. 结果评估，区带是永久性的，凝胶膜也可保存起来，便于将来参考，如果随时间延长，出现背景染色，说明凝胶清洗不够充分。

电泳图分析 将干燥的凝胶贴到凝胶记录表上，在起点上对齐点样孔，并进行测量，记录表的明黄色背景以毫米距离排列，与干燥的凝胶上紫色条带反差最大，并使条带更明显（图 13.5）。测量从点样区域中间到酶条带中间的距离作为酶的移动距离。记录酶迁移数据表上所测的标准、对照和未知酶的移动距离。将酶迁移数据导入细胞 I.D.最后的分析表，以确定其种系。确认未知物种的详细说明已含在表中，将这些表保存于笔记本中作为结果永久记录，每种酶的详细讨论都可在《细胞鉴定手册》（由 Innovative Chemistry，Inc.提供）中找到。

某些酶可以观察到多条带（如标准试剂 LD），在这种情况下，记录下那些密度足以测定的条带的迁移距离。取决于提取物的活性和染色过程的孵育时间，可能不能使所有条带都达到足够的密度，因此在酶的迁移数据库中，有可能不能查到所有条带的迁移距离，然而在大多数情况下，这不会对结果产生不利影响。

提取替代技术 细胞抽提物可通过超速离心、反复 3 次快速冻融，或用辛基乙烷处理（Macy，1978）来制备。细胞抽提物缓冲液，同样可从 Innovative Chemistry，Inc.获得。

用于细胞抽提的对照及标准试剂可从 Innovative Chemistry 获得，或者用标准程序（参见方案 13.3）自行制备。标准品从小鼠的 L-929 细胞系（ATCC® CCL-1™）制备，对照从人 HeLa 细胞系（ATCC® CCL-2™）制备。O'Brien 等（1980）报道样品可在–70℃保存 1 年而没有明显的酶活性丧失。

13.1.8 染色体含量

染色体含量或核型是确定细胞系与其来源的种属、性别联系最具特征、最明确的标准之一。人、马、小鼠的核型（UWMC Cytogenetics Laboratory，2012）及大鼠标样图谱（Szpirer，1996）都有现成的。人类细胞的标准染色体核型还可参见 Mitelman（1995），其他哺乳动物染色体图谱参见 O'Brien 等（2006）。染色体分析也可用于区分正常细胞和转化细胞（参见 22.2.2 节），因为染色体数量在正常细胞中更稳定（小鼠除外，因为外植培养后，正常细胞的配对染色体改变非常快）。

方案 13.4 染色体制备

概要

固定阻滞于 M 期的细胞，在低渗液中膨胀，将细胞滴在载玻片上，染色，观察（图 13.6）（Rothfels and Siminovitch，1958；Dracopoli et al.，2004）。

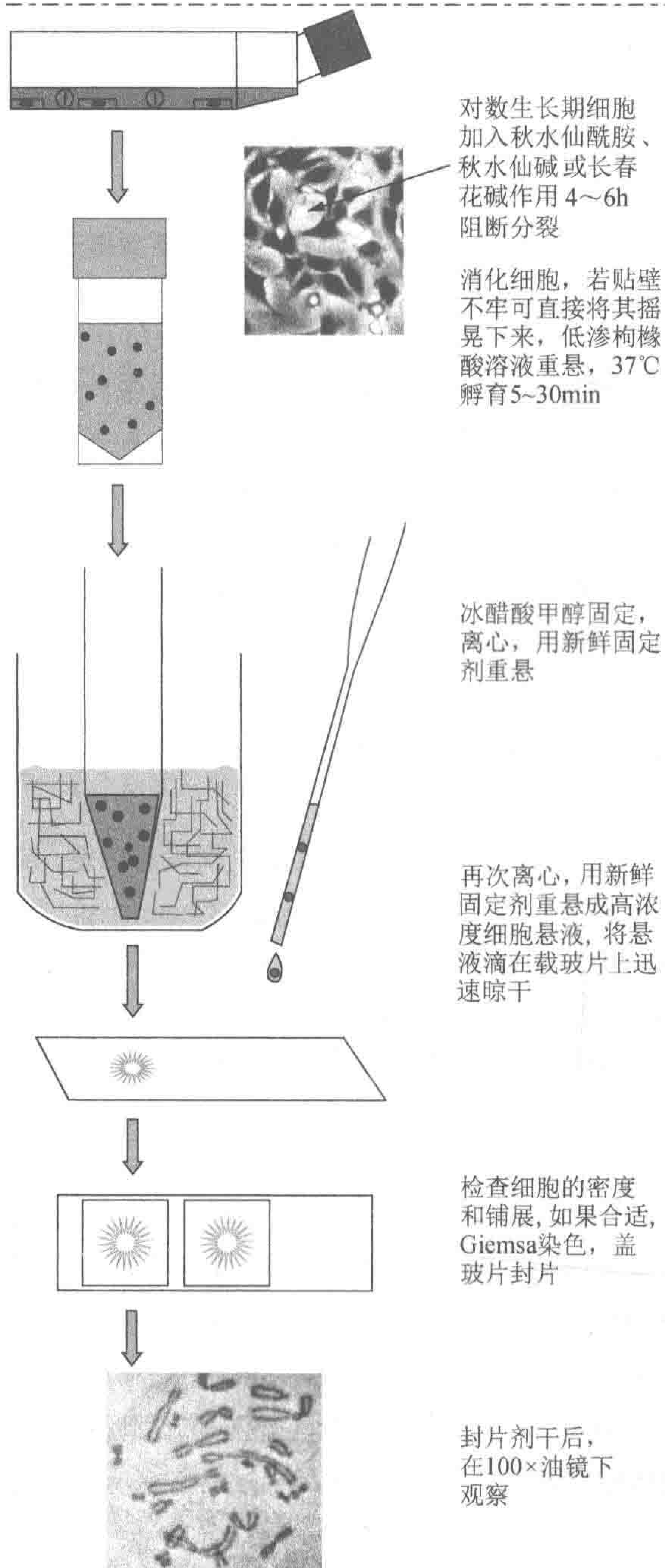


图 13.6 染色体制备。采用滴液技术制备单层培养细胞的染色体展片

材料

无菌

- 对数期的培养细胞
- 用 D-PBSA 配制的 10μmol/L 秋水仙酰胺
- D-PBSA

- 0.25%的粗提胰蛋白酶

非无菌

- 低渗溶液：40mmol/L KCl；25mmol/L 枸橼酸钠
- 乙酸甲醇固定液：一份冰醋酸加三份无水甲醇或乙醇，新鲜配制并在冰上保存
- Giemsa 染液
- DPX 或 Permount 封固剂
- 冰
- 离心管
- 巴斯德吸管
- 载玻片
- 盖玻片，#00
- 载玻片盒
- 低速离心机
- 涡流混悬器

操作步骤

1．将 2×10^4～5×10^4 个/mL（4×10^3~1×10^4 个/cm^2）的培养液 20mL 放入 $75cm^2$ 的培养瓶中培养。

2．3~5 天后，细胞处于对数生长期时，将 0.2mL 的 10μmol/L 秋水仙酰胺加入培养瓶内已有的培养基中，终浓度 0.1μmol/L。

3．4~6h 后，轻轻去掉培养基，加 5mL 0.25%胰蛋白酶，孵育 10min。

4．在胰蛋白酶液中离心细胞，弃掉上清胰蛋白酶。

5．以 5mL 低渗溶液重新混悬细胞，37℃条件下静置 20min。

6．加入等量新鲜配制的冰冷的乙酸甲醇，不停地混合，然后 100*g* 离心 2min。

7．弃掉上清混合物，在涡流混悬器上振荡细胞团块，再慢慢边混匀边加新制备的乙酸甲醇。

8．细胞在冰上静置 10min。

9．100*g* 离心细胞 2min。

10．弃掉上清乙酸甲醇，以 0.2mL 的乙酸甲醇溶液重新振荡混悬细胞团，直到细胞均匀分散。

11．用吸管吸一滴细胞悬液到吸管尖部，从约 12in（30cm）处滴到凉的玻片上，倾斜玻片，让液滴流下并铺开。

12．将玻片在盛有沸水的烧杯上迅速干燥，然后用相差显微镜观察。如果细胞均匀铺展而没有相互接触，则以同样浓度的细胞制备更多片子。如果细胞成堆重叠出现，则稀释悬液 2~4 倍之后，再准备一张滴液玻片。如果稀释的悬液中细胞较满意，就制备更多片子，若不满意，进一步稀释重复这一步骤。

13．进行 Giemsa 细胞染色：

（a）将玻片放在架子上，架子置于水池上。

（b）以数滴纯 Giemsa 染液完全覆盖载玻片，染色 2min。

（c）以约 10 倍体积的水浸没玻片。

（d）再静置 2min。

（e）用流水冲掉稀释过的染液。

注意事项 不能倒掉染液，因为氧化的染液浮渣会留在玻片上。即使在平皿中染色，染液也不能直接倒掉，而必须用水从下向上置换掉。

(f) 最后用水逐张冲洗玻片去除染液沉淀。

14. 显微镜下观察染色情况，如果满意，则将载玻片彻底干燥，用#00 盖玻片及 DPX 或中性树胶 Permount 封片。

可变条件

中期阻滞。1μmol/L 长春花碱可代替秋水仙酰胺；可延长中期的时间，获得更多的用于染色体计数的中期细胞，或缩短中期阻滞时间，降低染色体凝集程度，改善显带（参见 13.1.9 节）。

收集有丝分裂相。有些细胞如 CHO、HeLa，分裂中期时如果摇动培养瓶易脱壁（“摇脱”技术），可省去胰蛋白酶消化。具体步骤如下：加入秋水仙酰胺；小心移除秋水仙酰胺，以低渗枸橼酸/KCl 溶液置换；加入低渗液前或后摇动培养瓶，使中期细胞脱离原位；如前述方法固定细胞。

低渗处理。单独用 75mmol/L KCl 或用蒸馏水稀释到 50%的 HBSS 来代替方案 13.4 中使用的低渗枸橼酸溶液。低渗处理持续时间可以为 5~30min，以减少裂解或增强铺展程度。

展片。这一步骤比其他步骤处理方法更加多样，所有变化都为提高分散及其平展程度。这些方法包括：使细胞从更高的高度滴到玻片上（用夹子固定吸管，单用固定剂进行试滴，标记玻片位置）；火焰干燥（细胞滴落后，在火焰上加热干燥载玻片，或当液滴铺展时点燃载玻片上的液滴，燃烧掉固定液，但是后者会使接下来的显带操作更加困难）；超低降温载玻片（细胞滴片之前，玻片放在干冰上冷却）；细胞滴片之前，将细胞悬液置于冰箱冷藏过夜；将细胞滴在冷玻片上（例如，将载玻片浸入冷乙醇，再干燥去除乙醇），再将载玻片放在一杯沸水上；当液滴铺展时，倾斜玻片，吹动液滴流过玻片（另见方案 26.5-Su）。

13.1.9 染色体显带技术

这一组技术设计（Dracopoli et al.，2004，4.3 节）用于鉴定某些形态差别微小的配对染色体（Wang and Fedoroff，1972）。对于 G 带显带技术，染色体蛋白质被粗提胰蛋白酶部分消化掉，通过随后的染色而呈现带状。Q 带显带技术无需胰蛋白酶消化。每一对染色体都具有特征性带型（图 13.7）。其他显带方法包括：用胰蛋白酶和 EDTA 而不是单纯用胰蛋白酶的 G 带显带技术（图 13.7a）；Q 带显带技术（Caspersson et al.，1968）[用 45%乙酸配制 5%二盐酸喹吖因（*w/V*）进行细胞染色，冲洗载玻片，用 pH 4.5 的去离子水封片]；C 带显带技术，主要用于着丝粒区域显带。在 Giemsa 染色之前，固定片用 0.2mol/L HCl 预处理 15min 和 0.07mol/L NaOH 预处理 2min，然后用 SSC（0.03mol/L 枸橼酸钠，0.3mol/L NaCl 或 0.09mol/L 枸橼酸钠，0.9mol/L NaCl）处理过夜（参见方案 26.5-Su）。

现已建立了区分人和小鼠染色体的技术，主要是协助人和小鼠杂交体的染色体核型分析，这些方法包括用 Hoechst 33258 进行荧光染色（小鼠染色体着丝粒比人类着丝粒荧光染色更明亮）（Hilwig and Gropp，1972）和 Giemsa 的碱性染色法（“Giemsa-11”）（Bobrow et al.，1972；Friend et al.，1976）（图 13.7c）。

染色体彩绘 染色体染料可以从很多厂家买到（参见补充材料中的附录III）。杂交和检测的

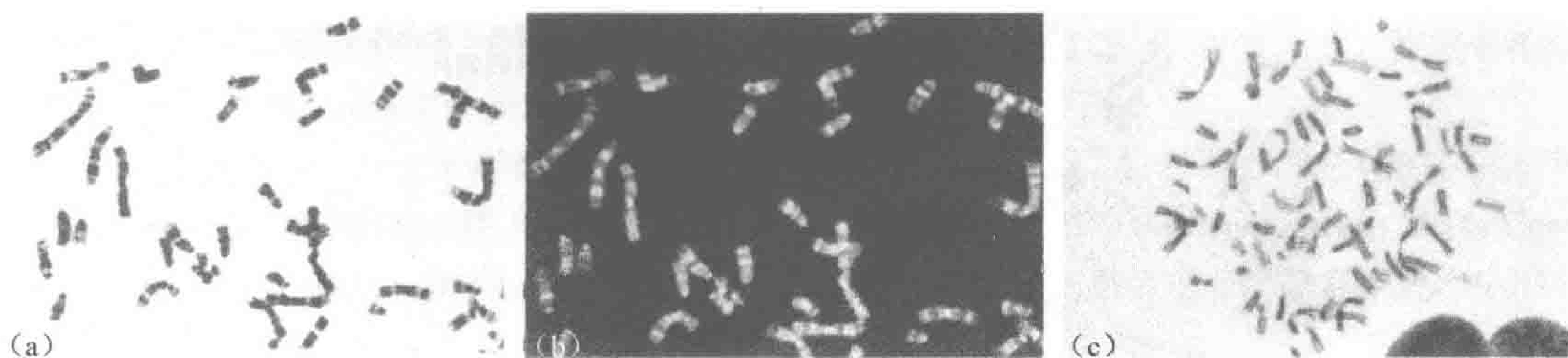


图 13.7　染色体染色。(a) 人类染色体用标准的胰蛋白酶-Giemsa 技术显带；(b) 与 (a) 制备方式相同，只是用 Hoechst 33258 染色；(c) Giemsa 染色的人类/小鼠杂交细胞染色体，pH 11，人类染色体的染色比小鼠的弱一些。可以看到一些人类/小鼠染色体易位现象（承 R. L. Church 教授授权使用）

方法因厂家不同而各有不同，但有一个通用的方案（Ausubel，2007，14.7 节；Dracopoli et al.，2004；4.6 节）。经典的核型分析通过染色体显带技术，使用染色体差异着色的染料来进行（参见方案 26.5-Su），因此每条染色体可以通过其相应带型来识别。但是，传统的显带技术不能鉴定复杂的染色体畸形。目前已经建立了基于染色体彩绘［称为光谱核型分析（SKY）或多色荧光原位杂交（M-FISH）］的新的核型分析方法。这些技术可以实现人类全部 23 条染色体以不同的颜色同时可视化。通过计算机实现的最终荧光模式的进一步可视化比人眼更为敏感。这些在鉴定那些以往通过传统方法不能发现的新的染色体改变方面取得了巨大的成功（Weinberg and Stanyon，1997；Lim et al.，2004；McDevitt et al.，2007）。

13.1.10　染色体分析

以下是染色体配对分析的方法。

(1) 染色体计数。计数 50~100 个铺展细胞的染色体，计数每个铺展细胞中染色体的数目（染色体无需分带），可借助与闭路电视或明场照相机。尽量计数所有能看到的有丝分裂相，并通过：①染色体数目；②在无法计数的情况下，对“不可数的近二倍体”或“不可数的多倍体”予以分类，将结果以直方图表示（参见图 2.11）。

(2) 染色体核型。数码拍照 10 个或 20 个较好的显带染色体铺展，用 Adobe Photoshop 或同类的图像处理程序，剪下每条染色体，粘贴到一个新的图片文件中，在图中可以旋转、修边、排列及分类（图 13.8），可用图像分析系统（如 Leica CW400）自动进行染色体图像的分类，得出核型。

染色体计数和染色体核型分析可以确定细胞种属，使用显带技术可以区分各种各样的细胞系及标记染色体，交叉污染源，染色体制备好做。这项技术区分种属间污染最容易，只需染色体计数配合染色体大体形态的快速检查，也许就足以确定或排除可疑的交叉污染。种属内污染常常需要进行染色体显带和核型分析。

13.1.11　身份认证的必要性

如果你不能或者不愿意亲自进行这些鉴定的实验操作，可以找一家商业服务公司去完成（参见补充材料中的附录III，身份认证），但不能什么都不做。通用的细胞系鉴定常用的方法见表 13.4（另见 Hay et al.，2000）。

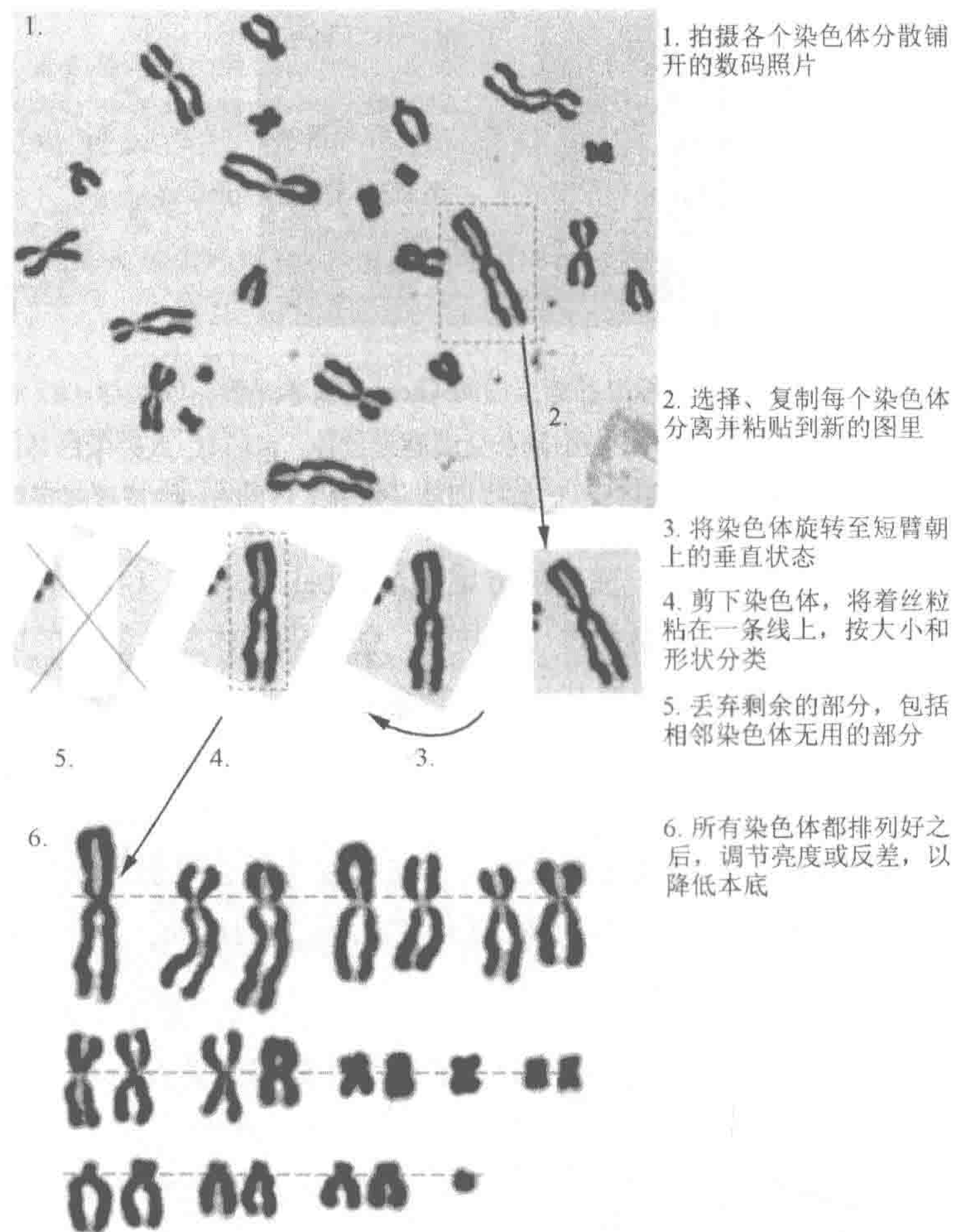


图 13.8 核型制备。从中期铺展细胞的电子图片制备染色体核型的步骤。Yerganian 和 Leonard（1961）的 Y-5 株再克隆的中国仓鼠细胞（乙酸地衣红染色）

表 13.4 细胞系和细胞株的鉴定

标准	方法	参考文献	方案编号
DNA 谱[a]	微卫星重复序列 PCR	Masters et al.，2001	15.11
核型[a]	染色体铺展显带	Rothfels and Siminovitch，1958；Dracopoli et al.，2004	15.9
同工酶分析	琼脂凝胶电泳	Hay，2000	15.12
基因组分析	芯片	van Beer and Nederlof，2006	—
基因表达分析	芯片	Sarang et al.，2003；Le Page et al.，2006；Staab et al.，2004	—
蛋白质组	芯片	Barber et al.，2009	—
细胞表面抗原	免疫组织化学	Hay，2000；Burchell et al.，1983，1987	15.13
细胞骨架	特异细胞角蛋白的免疫细胞化学	Lane，1982；Moll et al.，1982	15.13

a 大多适用于真实性鉴定

13.2 细胞身份的验证

不管是科学研究还是商业探索，合理使用细胞系，要求细胞系都是验证过的。在企业环境里，法律强制终产品要经美国食品药品监督管理局（FDA）或英国国家卓越临床研究中心（NICE）接

受。然而在科学研究实验室，要求没这么清楚，责任落到个人的良知上。尽管如此，使用未经验证的细胞系降低了研究的可信性及任何人重复的可能性（另见6.10节）。

验证包括身份认证、出处和微生物污染及其他动物细胞的污染，如前面所讨论（参见13.1节）。还要求细胞在GLP或相似条件下维持，如良好细胞培养规范（GCCP）（Geraghty et al.，2014；Coecke et al.，2005；Balls et al.，2006）。有关细胞培养验证的一些要素在后续章节中还有涉及。

13.2.1 细胞的身世记录

验证过程的一部分，要求就后面的问题保持记录：细胞是如何分离的，之后在细胞身上发生了哪些事［维持方法、污染检测（如果是用了污染去除程序）、表达的特性、基因修饰、自发变化及偶发事件］。有关细胞系起源的知识，从已发表文献中或从同事的口中得到，应首先加以筛选，独立核实后，添加到细胞系的工作进展中。这意味着要一直保持合适的记录（参见11.3.11节、12.5.8节、15.3.8节）、详细的常规维持、有意义的实验过程及冻存。不会花费过多劳动力，因为使用记录单或数据库，重复程序的新记录不用重新全部键入，除了新的和变化的。引用某个SOP也许就是全部要做的，完整的身世记录如古董家具或油画般获得价值。

13.2.2 微生物污染

不管你的记录如何详细或你的实验技术如何缜密，如果细胞系被一种或更多的微生物污染，工作成果就失去了价值或至少严重打折。污染明显时，不太构成问题，因为培养物就弃掉了，但若由于：①使用了抗生素（参见12.5.7节），②支原体污染，未做常规检测，③对污染微生物尚无常规检测方法，如有些病毒和朊蛋白（参见14.3.7节），污染常常是隐形的。污染可通过以下方法避免：①遵守恰当的无菌技术（参见5.1节），②从恰当验证过的来源获取细胞系，如一个细胞库（参见表15.5），③培养细胞时不使用抗生素，即使只有部分时间不用（参见12.5.7节或图12.9），④定期筛查支原体，用Hoechst 33258染色可以查出大小能达到荧光显微镜分辨率的含DNA的生物（参见14.1节），或者⑤用PCR法筛查最常见病毒或委托商业公司检测。

13.2.3 步骤

企业或商业实验室设计步骤及质量控制有严格的监管程序。大多数学术机构和研究机构的实验室倾向于不太正式的管理而宁愿遵从良好实验室规范（GLP）而获益（Good Laboratory Practice Regulations，1999；FDA，2007；USEPA，2012），其中包括质量保证的某些元素。GLP有许多方面，包括安全事务（参见第6章），但也强调保持记录、仪器设施的维护及试剂耗材供应的追溯。记录中不仅是特定时间做了什么相关数据，还要记录培养基、血清及其他试剂的批号，一般可追溯到供应商，同样他们也可追溯各种成分的供应商。这些常常是由条码系统来完成的，所以扫描器是细胞培养实验室有用的辅助用品。

标准操作程序（SOP） 在研究实验室中推行SOP是困难的，实验室每个小组可能需要步骤的变化并且需要随着研究进展而进行修正的能力。然而，推荐大家在共享的实验设施中，如组织培养实验室，在实验室中应该对特定的共同操作/实验有界定清晰的SOP。应该有手册，或者打印或者放在内网上，手册中列出原代培养、传代培养、克隆化培养、冷冻保存及其他共用程序的SOP，由此个体使用者可以演化自己的操作步骤。应有个人或者委员会负责手册的准备及更新，并与使用

者沟通确保他们对相关的要求也更新了。除非因为确凿的科学依据与设施的使用无法调和，不鼓励SOP的演变。然而，因为工作是实验性质的，也许SOP的改变是必要的。但在这些情况下，精确记录任何演变是很重要的。这也不一定意味着对SOP进行永久或通用的改变，当然一旦证明有益，也可以永久改变。但是，这种改变必须是基于共识并重新拟定新的 SOP。但需避免实验方案的随意转变及由此导致偶发偏离。

13.3 质量保证

不拘于操作步骤的控制，试剂和培养基的制备、设施的运行和仪器的维护都要进行常规检测是非常重要的。通用情况是制备试剂的人与质量控制的人是不同的，使用仪器的人与检测仪器的人不同，要保持质控记录，以便出问题时可查询，如细胞生长相关、污染来源等。质控的特殊要求在其他章节中有论述（参见 6.10 节、10.6 节、12.5.6 节、14.3 节）。

13.3.1 细胞系

除身份错误认定之外，细胞系还具有不稳定倾向，①因为在原代培养建立的早期细胞正处于适应期（参见 2.7.2 节），②因为依赖培养基组分和基质的性质，细胞会丢失或改变表达某些表型特征（参见 19.1 节），③因为细胞可发生自发转化（参见 22.2 节、22.3 节）。因此，清楚以下情况是重要的：细胞的生长特性，哪怕是间接了解，如传代后做个铺板实验及达到相同密度后再传代（参见 12.5.6 节）并确保细胞表达相同的特性。这些情况在细胞系日常工作中可能就很明显，但在某些情况下需要建立监控检测指标，例如，某个基因的扩增情况、对某个病毒的敏感性，或某个产物的合成情况。

13.3.2 培养基和试剂

商业来源的大多数培养基和试剂供应商已进行了质量控制。通常涵盖细胞生长或铺板效率。但不包含用户的特殊需求，如某个具体细胞系或分析或准备程序。有些天然产物，如血清或胰蛋白酶，也许筛选了常见污染病毒，通常不测朊蛋白。所以你自己购买材料的质控程序中也许需要增加。

13.3.3 培养器皿

与试剂和培养基一样，一次性塑料培养器皿也许供应商已经进行了质量控制（QC），但也许还需要检测以用于自己的特殊用途。通常是生长测试（参见 23.9.2 节）、铺板率（参见 23.10 节）和自己特定的步骤的检测。这些检测应在购买前进行，不行就更换供应商。

13.3.4 仪器

每件仪器，如生物安全柜、高压灭菌锅、干热消毒仪、孵箱、冰箱（常规的、超低温的及冷冻柜），都要指定专人负责，安排并记录检修（参见 6.5.2 节）。更可取的是，常用的人负责，即熟悉其操作又知道其要求。所有电器都要检查是否接地漏电（earth leakage），若提示仪器内有短路，需要上门维修。根据周围环境，生物安全柜每 6 个月或 1 年需要检测高效滤器的完整性，通常用压力

计测量滤器两侧压力下降情况即可。流速的不规则提示滤器不完整或有漏洞，流速下降伴压力下降增加提示滤器阻挡，正在失效。

13.3.5 设施

细胞培养间应该有监控，空气质量、温度和湿度及任何可能影响无菌工作的其他活动如以前的检修或新仪器的引入等都应有记录。

参 考 文 献

Abaan OD, Polley EC, Davis SR, Zhu YJ, Bilke S, Walker RL, Pineda M, Gindin Y, Jiang Y, Reinhold WC, Holbeck SL, Simon RM, Doroshow JH, Pommier Y, Meltzer PS (2013). The exomes of the NCI-60 panel: A genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res.* **73**(14):4372–4382.

Almeida JL, Hill CR, Cole KD (2011). Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnol.* **11**:102.

Almeida JL, Hill CR, Cole KD (2014). Mouse cell line authentication. *Cytotechnology* 66:133–147. (PMID: 23430347).

ANSI/ATCC ASN-0002-2011. *Authentication of human cell lines: Standardization of STR profiling* (http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2FATCC+ASN-0002-2011).

ASN-0002 (2010). American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: The beginning of the end. *Nat. Rev. Cancer* **10**:441–448.

ATCC STR (American Type Culture Collection–Short Tandem Repeat) database (www.atcc.org/en/STR_Database.aspx; www.lgcstandards-atcc.org/STR_Database.aspx?geo_country=gb).

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) (2009). *Current protocols in molecular biology*, Unit 14.7. Hoboken, NJ: Wiley.

Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, Shokri F (2007). Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: Report from the National Cell Bank of Iran. *Biologicals* **35**:195–202.

Bady P, Diserens AC, Castella V, Kalt S, Heinimann K, Hamou MF, Delorenzi M, Hegi ME (2012). DNA fingerprinting of glioma cell lines and considerations on similarity measurements. *Neurol. Oncol.* **14**(6):701–711.

Balls M, Coecke S, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman LM, Stacey G, Stokes W (2006). The importance of good cell culture practice (GCCP). *ALTEX* **23**(suppl.):270–273.

Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado, Barcode of life (www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding).

Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L.(2010). Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **46**:727–732.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **38**(11 Part 1):3751–3757.

Bobrow M, Madan J, Pearson PL (1972). Staining of some specific regions on human chromosomes, particularly the secondary constriction of no. 9. *Nature* **238**:122–124.

BOLD (Barcode of Life Data) Systems (2014) (www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine).

Boonstra JJ, van der Velden AW, Beerens EC, van Marion R, Morita-Fujimura Y, Matsui Y, Nishihira T, Tselepis C, Hainaut P, Lowe AW, Beverloo BH, van Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN. (2007). Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7. *Cancer Res.* **67**:7996–8001.

Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. (2004). Cell line cross-contamination: How aware are mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **40**:211–215.

Butler JM (2011). Forensic DNA testing. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011 Dec 1;2011(12):1438–50 (PMID: 22135660).

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, Macleod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer* **127**:1–8. PMID: 20143388

Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L (2013a). Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *Int. J. Cancer* **132**(11):2510–2519.

Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch K, Masters JRW, Nakamura Y, Nims RW, Storets DR, Dirks WG, MacLeod RAF, Drexler HG (2013b). Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line. *Genes Chrom. Cancer* **52**:986–988.

Carson SD, Pirruccello SJ. HeLa cell heterogeneity and coxsackievirus B3 cytopathic effect: Implications for inter-laboratory reproducibility of results. *J. Med. Virol.* **85**(4):677–683.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **49**:219–222.

Castro F, Dirks WG, Fähnrich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M (2012). High-throughput SNP-Based authentication of human cell lines. *Int. J. Cancer*, 132:308–314 (PMID: 22700458).

Chen TR, Dorotinsky C, Macy M, Hay R (1989). Cell identity resolved. *Nature* **340**:106.

Chen TR (1988). Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and Hep-2 karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet.* **48**:19–22.

Christgen M, Lehmann U (2007). MDA-MB-435: The questionable use of a melanoma cell line as a model for human breast cancer is ongoing. *Cancer Biol. Ther.* **6**:1355–1357.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W (2005). Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern.*

Lab. Anim. **33**(3):261–287.

Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R, Ikonomi P (2007). Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **43**(10):344–351.

COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) Cell Line Project (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/)..

Demichelis F, Greulich H, Macoska JA, Beroukhim R, Sellers WR, Garraway L, Rubin MA (2008). SNP panel identification assay (SPIA): A genetic-based assay for the identification of cell lines. *Nucleic Acids Res.* **36**(7):2446–2456.

Didion JP, Buus RJ, Naghashfar Z, Threadgill DW, Morse HC 3rd, de Villena FP (2014). SNP array profiling of mouse cell lines identifies their strains of origin and reveals cross-contamination and widespread aneuploidy. *BMC Genomics* **15**(1):847.

Dirks WG, MacLeod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H (2010). Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **126**:303–304.

Dirks WG, MacLeod RAF, Drexler HG (1999). ECV3O4 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): Cell line cross-contamination at source. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **35**:558–559.

Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Rosenzweig A, Seidman JG, Smith DR (eds.) (2004). *Short protocols in human genetics*. Hoboken, NJ: Wiley.

Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG, MacLeod RA (2002). Mix-ups and mycoplasma: The enemies within. *Leuk. Res.* **26**(4):329–333.

DSMZ online STR analysis (http://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html).

Ellison G, Klinowska T, Westwood RFR, Docter E, French T, Fox JC (2003). Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *J. Clin. Pathol.* **55**:294–299.

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* **75**(3):991–1003.

FDA (2007). Guidance for industry. Good laboratory practices; questions and answers. (http://www.fda.gov/downloads/ICECI/EnforcementActions/BioresearchMonitoring/UCM133748.pdf)

FDA (2013). CFR–*Code of Federal Regulations* Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies (www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58&showFR=1).

Fomovskaia G, Smith MA, Davis JC, Jones K, Fomovsky MA (2004). *FTA-coated media for use as a molecular diagnostic tool.* US Patent 6,746,841.

Friend KK, Dorman BP, Kucherlapati RS, Ruddle FH (1976). Detection of interspecific translocations in mouse–human hybrids by alkaline Giemsa staining. *Exp. Cell Res.* **99**:31–36.

Gartler SM (1967). Genetic markers as tracers in cell culture. *2nd Decennial Review Conf. Cell, Tissue and Organ Culture.* NCI Monograph 26, pp. 167–195.

GE Healthcare (2009). Whatman FTA™ for the protection and storage of DNA. Data file 51750 (https://promo.gelifesciences.com/na/K13080/misc/Protection_storage.pdf?extcmp=K13080-GL-Brochures-SC_prot_stor_DF).

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, McDermott U, Marshall C, Masters JRW, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **111**:1021–1046.

Good Laboratory Practice Regulations (1999) (www.legislation.gov.uk/uksi/1999/3106/contents/made).

Häne B, Tümmler M, Jäger K, Schleithoff L, Janssen JW, Drexler HG (1992). Differences in DNA fingerprints of continuous leukemia-lymphoma cell lines from different sources. *Leukemia* **6**(11):1129–1133.

Hay RJ, Miranda-Cleland M, Durkin S, Reid YA (2000). Cell line preservation and authentication. In MastersJRW (ed.), *Animal cell culture*. Oxford, UK: Oxford Univ.Press, , pp. 69–103.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. B* **270**(1512):313–321.

Hilwig I, Gropp A (1972). Staining of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes with a new fluorochrome. *Exp. Cell. Res.* **75**:122–126.

Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C (2007). The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechnique*, **43**:575, 577–578, 581–582 passim.

ICLAC (2015) (http://iclac.org/).

Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* **7**(4):544–548.

Jeffreys AJ (2013). The man behind the DNA fingerprints: An interview with Professor Sir Alec Jeffreys. *Invest. Genet.* **4**(1):21.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985). Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* **316**:76–79.

Jiang T, Wang H (2014). Identification of cross-contamination in SH-SY5Y cell line. *Hum. Cell*, 27:176-178. (PMID: 25182563).

Kovalevich J, Langford D (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol.* **1078**:9–21.

Lacroix M (2008). Persistent use of "false" cell lines. *Int. J. Cancer* **122**:1–4.

Lander ES, Budowle B (1994).. DNA fingerprinting dispute laid to rest. *Nature* **371**(6500):735–738.

Langdon SP (2004). Characterization and authentication of cancer cell lines: An overview. *Methods Mol. Med.* **88**:33–42.

Lavappa KS, Macy ML, Shannon JE (1976). Examination of ATCC stocks for HeLa marker chromosomes in human cell lines. *Nature* **259**:211–213.

Liang-Chu MM, Yu M1, Haverty PM, Koeman J, Ziegle J, Lee M, Bourgon R, Neve RM (2015). Human biosample authentication using the high-throughput, cost-effective SNPtraceTM system. *PLoS ONE* **10**(2):e0116218.

Lim G, Karaskova J, Vukovic B, Bayani J, Beheshti B, Bernardini M, Squire JA, Zielenska M (2004). Combined spectral karyotyping, multicolor banding, and microarray comparative genomic hybridization analysis provides a detailed characterization of complex structural chromosomal rearrangements associated with gene amplification in the osteosarcoma cell line MG-63. *Cancer Genet. Cytogenet.* **153**:158–164.

Liscovitch M, Ravid D (2007). A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* **245**:350–352.

Lorenzi PL, Reinhold WC, Varma S, Hutchinson AA, Pommier Y, Chanock SJ, Weinstein JN (2009). DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol. Cancer Ther.* **8**(4):713–724.

MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG (1999). Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int. J. Cancer* **83**(4):555–563.

MacLeod RA, Kaufmann M, Drexler HG (2011). Cytogenetic analysis of cancer cell lines. *Methods Mol. Biol.* **731**:57–78.

Macy M (1978). Identification of cell line species by isoenzyme analysis. *Manual Am. Tissue Cult. Assoc.* **4**:833–836.

Masters JR, Alston-Roberts C, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Dirks WG, Freshney RI, Healy L, Kerrigan L, Kohara A, Korch C, MacLeod RA, Nakamura Y, Nims RW, Reid YA, Storts DR, Capes-Davis A (2012). Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature* **492**(7428):186 (full list of authors included in supplementary data).

Masters JRW, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, Toji LH, Ohno T, Tanabe H, Arlett CF, Kelland LR, Harrison M, Virmani A, Ward TH, Ayres KL, Debenham PG (2001). STR profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:8012–8017.

McDevitt MA, Condon M, Stamberg J, Karp JE, McDiarmid M (2007). Fluorescent in situ hybridization (FISH) in bone marrow and peripheral blood of leukemia patients: Implications for occupational surveillance. *Mutat Res.* **629**:24–31.

McLaren RS, Reid Y, Storts DR (2013). Human cell line authentication: The critical first step in any project using human cell lines. *Methods Mol. Biol.* **963**:341–353.

Mitelman F (ed.) (1995). *ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature*, Basel: Karger.

Musgrave-Brown E, Ballard D, Balogh K, Bender K, Berger B, Bogus M, Børsting C, Brion M, Fondevila M, Harrison C, Oguzturun C, Parson W, Phillips C, Proff C, Ramos-Luis E, Sanchez JJ, Sánchez Diz P, Sobrino Rey B, Stradmann-Bellinghausen B, Thacker C, Carracedo A, Morling N, Scheithauer R, Schneider PM, Syndercombe Court D (2007). Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* **1**(2):186–190.

NCBI STR database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/).

Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR, Hawthorne PK (1974). Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science* **184**(4141):1093–1096.

Nelson-Rees WA, Daniels D, Flandermeyer RR (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science* **212**(4493):446–452.

Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR (1976). HeLa cultures defined. *Science* **191**:96–98.

Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR (1977). Inter- and intraspecies contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science* **195**:1343–1344.

Nims RW, Shoemaker AP, Bauternschub MA, Rec LJ, Harbell JW (1998). Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **34**:35–39.

Nims RW, Sykes G, Cottrill K, Ikonomi P, Elmore E (2010). Short tandem repeat profiling: Part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **46**(10):811–819.

O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH (1980). Molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: Isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro* **16**:119–135.

O'Brien SJ, Menninger JC, Nash WG (2006). *Atlas of mammalian chromosomes*. Hoboken, NJ: Wiley.

O'Donoghue LE, Rivest JP, Duval DL (2011). Polymerase chain reaction-based species verification and microsatellite analysis for canine cell line validation. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**(4):780–785.

Ogura H, Yoshinouchi M, Kudo T, Imura M, Fujiwara T, Yabe Y (1993). Human papillomavirus type-18 DNA in so-called HEP-2-cells. KB-cells and F1-cells– further evidence that these cells are HeLa-cell derivatives. *Cell Mol. Biol.* **39**:463–467.

Parson W, Kirchebner R, Mühlmann R, Renner K, Kofler A, Schmidt S, Kofler R (2005). Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *FASEB J.* **19**(3):434–436.

Phuchareon J, Ohta Y, Woo JM, Eisele DW, Tetsu O (2009). Genetic profiling reveals cross-contamination and misidentification of 6 adenoid cystic carcinoma cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. *PLoS ONE* **4**:e6040.

Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells–a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res. Treat.* **104**:13–19.

Reid YA (2011). Characterization and authentication of cancer cell lines: an overview. *Methods Mol. Biol.* **731**:35–43.

Rothfels KH, Siminovitch L (1958). An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells growth *in vitro*. *Stain Technol.* **33**:73–77.

Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenthi U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR (2008). Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **3**:4331–4341.

Stacey GN (2000). Cell contamination leads to inaccurate data: We must take action now. *Nature* **403**(6768):356.

Stacey GN, Masters JRM, Hay RJ, Drexler HG, MacLeod RAF, Freshney RI (2000). Cell contamination leads to inaccurate data: We must take action now. *Nature* **403**:356.

Stratton MR, Darling J, Pilkington GJ, Lantos PL, Reeves BR, Cooper CS (1989). Characterization of the human cell line TE671. *Carcinogenesis* **10**:899–905.

Szpirer C, Szpirer J, Klinga-Levan K, Stahl F, Levan G (1996). The rat: An experimental animal in search of a genetic map. *Folia Biol. (Prague)* **42**:175–226 (http://ratmap.gen.gu.se/Idiogram.html).

Tanabe H, Takada Y, Minegishi D, Kurematsu M, Msui T, Mizusawa H (1999). Cell line individualization by STR multiplex system in the cell bank found cross-contamination between ECV304 and EJ-1/T24. *Tissue Cult. Res. Commun.* **18**:329–338 (not found in PubMed).

Torsvik A, Røsland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, Lønning PE, Primon M, Sobala E, Tonn JC, Goldbrunner R, Schichor C, Mysliwietz J, Lah TT, Motaln H, Knappskog S, Bjerkvig R (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: Putting the research field on track. *Cancer Res,* **70**:6393–6396.

USEPA (2012). *Good laboratory practices standards* (www.epa.gov/oecaerth/monitoring/programs/fifra/glp.html).

UWMC Cytogenetics Laboratory (2012) (www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/).

Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**:205–225.

Van Helden PD, Wiid IJ, Albrecht CF, Theron E, Thornley AL, Hoal-van Helden EG (1988). Cross-contamination of human esophageal squamous carcinoma cell lines detected by DNA fingerprint analysis. *Cancer Res.* **48**:5660–5662.

Varella-Garcia M, Boomer T, Miller GJ (2001). Karyotypic similarity identified by multiplex-FISH relates four prostate adenocarcinoma cell lines: PC-3, PPC-1, ALVA-31, and ALVA-41. *Genes Chrom. Cancer* **31**:303–315.

Wang HC, Fedoroff S (1972). Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nat. New Biol.* **235**:52–53.

Wienberg J, Stanyon R (1997). Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:784–791.

Yerganian G, Leonard MJ (1961). Maintenance of normal *in situ* chromosomal features in long-term tissue cultures. *Science* **133**:1600–1601.

（刘玉琴 译）

第14章

污　　染

14.1　污染的来源

对于组织培养的新手来说，保持无菌依然是非常大的挑战之一。在早期培训期间，生疏可以通过练习来克服，但是，在某些情况下，即使最有经验的工作者也要面对污染的困扰。潜在的污染来源有许多种（图 14.1），包括：①溶液、玻璃器皿和移液管的灭菌程序出错；②室内空气中

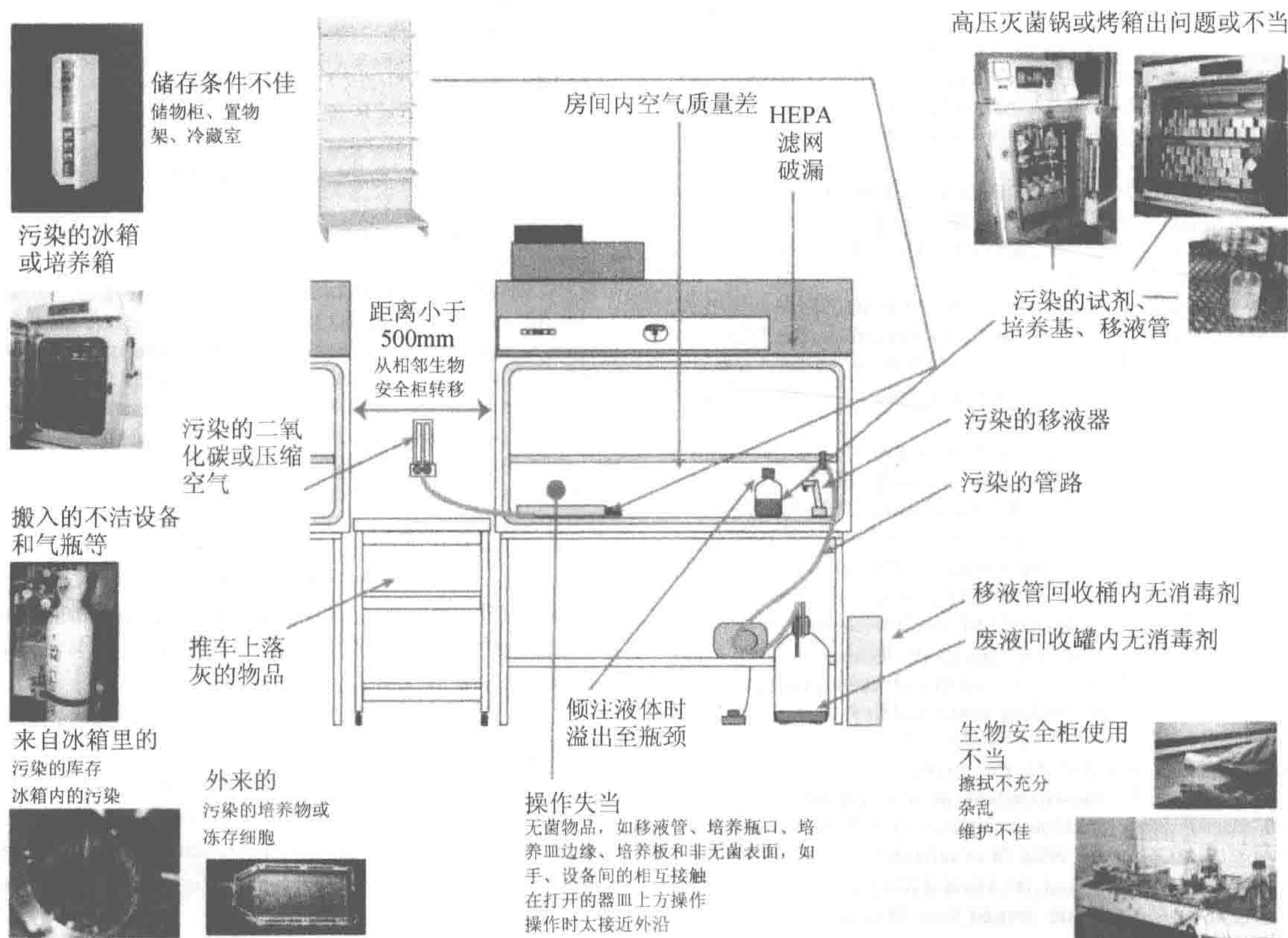


图 14.1　污染的来源。污染可能来自于外界引入的污染储存容器（左下），带入污浊的设备（左中），储存区或培养箱条件不佳（左上），空气质量不好（中上），试剂和培养液灭菌不完全（右上），生物安全柜使用不当（右下），或技术不精湛（中下）（表 14.1）

的气流和粒子（灰尘和孢子）；③培养箱和电冰箱维护差；④有问题的生物安全柜；⑤引入已经被污染的细胞系或者活体组织；⑥无菌操作上的失误（表 14.1）。其中第 6 个来源很可能是最为重要的。

表 14.1 污染路径

路径或者原因	预防措施
操作技术	
操作、移液和分配等	
非无菌表面和仪器	清洁不是马上要使用物品的工作区域
瓶口、瓶外和工作台表面的溢出物	70%乙醇常规擦拭。不要倾倒液体。用移液管、自动分配器或者传递装置分配或者移液。如果必须倾倒液体，则需：①平缓操作；②丢弃倾倒的瓶子；③擦拭溢出物
接触或者抓握移液管的位置过低，触摸瓶颈和螺旋帽内侧	手持移液管刻度以上部分
废液缸内的液体溅出	不要在容器上方工作 用漏斗将废液倒入废液缸，或者更为理想的，通过真空泵将废液抽入蓄水池
沉积的灰尘或皮肤颗粒掉落在培养物或培养瓶上；手或装置停留在开口的平皿或培养瓶上方	不要在开口的瓶子或平皿的上方（垂直层流并开放的工作台）或后上方工作（水平层流）
工作表面	
灰尘和漏液	在工作前、工作期间及工作后用 70%乙醇擦拭表面并立即擦净漏液
操作者的毛发、手、呼吸、衣物	
来自于皮肤、毛发或衣物的灰尘掉落或吹到培养物中	彻底洗净双手或戴手套。穿一件袖口收紧的无棉绒实验服，并用手套压住袖口
言谈、咳嗽、喷嚏等的喷雾	将谈话保持到最低限度，说话时将脸转开远离工作区；避免在感冒或咽喉感染时工作，或者戴口罩。将长发扎起或戴帽子穿一件不同于常规实验区或动物房的实验服
耗材和试剂	
溶液	
非无菌试剂和培养基	在使用前将试剂过滤或高压灭菌
不洁净的储存条件	清洁储存区并常规消毒
不适宜的灭菌程序	采用记录温度计或灭菌探测器监控高压灭菌锅的性能（参见补充材料中的附录III和方案 10.5） 在使用后通过起泡点或微生物分析检测滤膜的完整性 灭菌后检测所有试剂
不可信的供应商	检测试剂；更换供应商
玻璃容器和螺帽	
储存中的灰尘和孢子	用锡箔紧裹盖子。在拿入生物安全柜前用 70%乙醇擦拭瓶子 从架子后面更新货物。不要储存任何开封物品超过 24h
无效的灭菌（如过满的烤箱或密封的瓶子，蒸汽进气受阻）	在灭菌全程检测灭菌包的温度。在高压灭菌锅中，保持空瓶瓶口拧松。正确放置烤箱和高压灭菌锅（参见方案 10.1）

续表

路径或者原因	预防措施
器械，移液管	
无效的灭菌	在使用前干热灭菌物品 监控烤箱的运行
与非无菌表面或其他材料接触	重新消毒器械（用70%乙醇；灼烧并冷却器械） 不要碰到任何将进入培养容器的器械或移液管任何部位
使用中的培养瓶和培养基瓶	
孵箱或冰箱中的灰尘和孢子	用螺旋瓶盖代替塞子。在放入生物安全柜前擦拭瓶子。将培养板和平皿放入盒内
不洁净的储存或孵育条件	在储存或孵育时用铝箔包裹瓶盖和瓶颈 在使用前用70%乙醇擦拭培养瓶和瓶子 定期清洁储存间和孵箱
存于瓶盖内并溢出瓶子的培养基	丢弃所有瓶颈出现漏液的瓶子。不要倾倒
仪器和设备	
室内空气	
通风、气流、涡流、灰尘、悬浮微粒	清洁过滤空气 减少运输和不必要的活动 常规擦拭地板和工作台面
生物安全柜	
多孔滤器	常规检查滤器是否破损和泄露
更换滤器	检查穿过滤器的压力液珠
漏液，特别是在缝隙和工作台面下	定期清洁工作台面周边和下面，让乙醇渗入缝隙
干式恒温器	
在溢出液上生长霉菌和细菌	用70%乙醇纱布擦净所有溢出液。常规清扫恒温器
CO_2湿润孵箱	
在湿润的大气中，内壁和隔板上生长霉菌和细菌	先用清洁剂后用70%乙醇清扫（参见方案5.4）
鼓风循环携带的孢子等	将开放的平皿放入有严密盖子的塑料盒内（但是不要密封盖子） 在打开前用70%乙醇擦拭孵箱 在孵箱内用于湿润的水内加入杀真菌剂或细菌素（但要先明确无毒性）
其他仪器	
气瓶、泵等上的灰尘	进房间前先用70%乙醇擦拭
来自动物房木制家具，或工作台、孵箱内及小鼠等的污染 **螨虫、昆虫和其他污染物**	
螨虫等进入无菌包	密封所有无菌包 可能的话避免使用木家具；使用整体化塑料层压材料或不锈钢工作台面 如果使用木家具，用聚氨酯清漆或蜡上光剂密封，并且定期用消毒剂清洗 动物不进入组织培养实验室

续表

路径或者原因	预防措施
生物材料的进入	
组织样本	
来源于样本或者解剖时的感染	不要将动物带入组织培养实验室 在解离液内混入抗生素（参见方案 11.3） 将所有可能存在污染的大块组织在 70%乙醇中浸泡 30s
引入的细胞系	
来源或运输中污染	单独处理这些细胞系，最好在所有其他无菌工作都完成后，进行隔离检疫。在使用后用含 2%酚醛消毒剂的 70%乙醇擦拭超净台或生物安全柜，第二天早上前不再使用 不加抗生素培养两周以检测污染（第一次再培养时留备份并加入抗生素培养） 通过相差显微镜和从外观判断污染，通过 Hoechst 染色检查支原体。使用指示细胞在第一次传代培养前筛查

注：在该表中，预防和原因之间并不意味着是一对一的关系；预防措施是相互交错的并且可能与一种或多种原因相关

14.1.1 操作者的技术

如果试剂是无菌的并且仪器按照适当的操作规程运行，那么污染则取决于操作者的操作和环境条件的相互作用。如果操作者技术水平很高、操作严谨并且环境洁净无尘、不受干扰，则污染基本不会由于操作的问题而出现。环境恶化（如建筑工程或者季节性的湿度增加）或者操作员技术水平下降（遗漏一个或多个似乎不必要的预防措施）导致污染的概率增加，假如这些同时或者连续发生，那结果可能是灾难性的。

如曲线图所示，让我们设想一下这些事件的综合作用（图 5.1）。保持良好的操作可以由上面的曲线来表示，其中偶尔的失误显示为一个向下的峰；环境的品质则由下面的曲线描述，不规律的偶尔出现风险增加，例如，被污染的培养皿意外地在环境中打开或者仪器维护时产生灰尘，显示为一个向上的峰。假如两条曲线（好的操作和高质量的环境）保持良好的分离状态，技术失误和环境失衡就很少同时发生。然而，假如技术或者环境方面出现连续的失误，污染的频率将会增加；假如两个条件都恶化，污染将会变得经常而广泛。

14.1.2 环境

很明显，进行组织培养的环境必须尽可能干净，并且远离干扰和来往通道。应该避免在常规实验室区域进行组织培养；在普通实验室复杂环境中，生物安全柜并不能给予充分的防护。应指定一个洁净、远离通道的区域，最好是一个独立的房间或者套间（参见 3.2.1 节和 5.2.2 节）。从仓库搬入无菌区的设备，以及门、冰箱、离心机和操作者移动造成的气流都增加了污染的风险。严格遵守表面和仪器的清洁程序，用灭菌抹布擦净所有引入的物品。

14.1.3 生物安全柜的使用和维护

最常见的技术不足的范例是不正确地使用生物安全柜。假如工作环境由于瓶子和设备而过度拥挤（图 5.4b），层流被干扰，就失去了操作者和房间之间的保护边界层，继而导致有菌的空气进入生物安全柜，释放潜在的生物毒害的物质进入房间；此外，会增加无菌移液管和瓶子或其他物品有菌表面之间接触的风险。仅当物品直接参与当前操作时，才可被带入生物安全柜。

生物安全柜必须由有资质的工程师定期维护，且每年至少两次检查过滤器、管道系统和外壳的完整性。工程师也应该检查工作区的封闭度，确保内部空气没有散出、外部空气没有进入，而这些都依赖于内部的气流速度和外部的湍流。

14.1.4 湿度恒温箱

污染的一个主要来源是湿度恒温箱（参见 5.5.2 节）。除非使用开放的容器，否则并不需要高湿度；密闭的培养瓶最好使用干燥恒温箱或者温室（参见 3.2.5 节和 4.3.1 节）。可以采用低 CO_2 培养基（如基于 Hanks 盐溶液；见 8.2.2 节），以避免培养瓶对 CO_2 气体交换的需要。如果需要进行 CO_2 气体交换，最好通过气缸或气管供给，培养瓶密封并置于普通恒温箱中（尽管它们需要在大约 30min 后短暂排气）。使用透气瓶盖（参见 5.5.4 节和 7.3.6 节）最小化了污染风险，但是与干燥恒温箱比，仍然使培养瓶暴露于风险较高的空气中。如果拧松瓶盖或透气瓶盖的培养瓶持续放在 CO_2 恒温箱内，尽可能保持恒温箱干燥，并且使用不同的恒温箱培养开放的培养板。如果恒温箱干燥使用，CO_2 监控系统需要重新校准，并且要确认培养瓶内液体的蒸发状况；最好在 pH 平衡后拧紧瓶盖。

然而，在很多情况下必须使用湿度恒温箱。选择一个带有可以很容易直接清洁（图 4.16）的内胆的恒温箱可以减少污染的风险。应每周更换保湿托盘内的逆渗透（RO）或去离子水［请勿使用超纯水（UPW）］。恒温箱内的培养物可以隔离在一个塑料盒内（图 5.11），但是 pH 和温度的平衡需要更长的时间。CO_2 恒温箱内的循环风机可以缩短 CO_2 和温度的恢复时间，而代价是增加了污染的风险（参见 4.3.2 节和 5.5.2 节）；开放培养最好维持在静止的大气中，并且将访问频率尽可能降至最低。对密封培养瓶使用干燥的非 CO_2 恒温箱，缩短如胰蛋白酶消化等操作程序，可以帮助减少开启用于开放培养和克隆的恒温箱。

杀真菌剂 铜衬里的恒温箱本身减少了真菌生长，但是通常比常规款贵 20%~30%。将铜箔放在加湿托盘内也可以抑制真菌的生长，但是仅限于托盘，而不能保护恒温箱的内壁。有很多常用的真菌抑制剂，包括硫酸铜、核黄素、十二烷基硫酸钠（SDS）和 Roccal-D（Pfizer 公司），一种使用 2%溶液的专业杀真菌清洁剂。对于使用和未使用 Roccal-D 的恒温箱进行集落形成比较显示，Roccal-D 没有毒性作用。然而，Roccal-D 现在已经被替换为 Rocca-D Plus，后者含有 1%的双氮三基锡氧化物（bis-*n*-tributyltin oxide），所以可能需要重新试验验证。这些抑制剂中很多是清洁剂，所以重要的是，不能有 CO_2 或气路的气泡经过加湿托盘，否则液体会起泡。要牢记的是，杀真菌剂只能保护托盘；没有常规清洁的替代方法。

清洁恒温箱 清洁应该常规进行，使用 1% Roccal-D（Pfizer）或等效的无毒抗真菌清洁剂（见

5.5.2 节和方案 5.4)。用开盖式的板或皿培养细胞，如果频发污染常要追溯到恒温箱。

14.1.5 冷藏库

如果没有定期清洁，冰箱和冷藏室可能会成为污染的主要来源（参见章节 5.5.1)。如果发生了污染，特别是真菌污染，且累及了多人的样本，那么很可能是该污染源导致的。从冷藏库内拿出的任何物品在放入生物安全柜前需用乙醇擦拭，并且冷藏室和冰箱的清洁管理规定应被严格落实。

14.1.6 无菌材料

假如在内部（参见 10.6 节）或者供应商有适当的质量控制被执行，应该没有源于无菌培养瓶和试剂的污染风险。然而，也会有灭菌失败的状况出现，例如，灭菌包装得太紧，灭菌烘箱或者高压灭菌锅存在冷点，包装在储存前或储存中被戳破，或者一个低级别的污染没有被质量控制检测到（参见 28.4 节)。遵循正确的程序（参见 10.6 节)，确保所有包装被正确密封，并且通过在包裹中间统一容器内的探针监控所有灭菌包。

当新同事进入组织培养实验室时，让他们熟悉灭菌程序（参见 27.2 节）是非常重要的，即使他们并不直接参与这些程序，也应该知道无菌和非无菌物品的位置及区别（参见 3.2.7 节)。一名新成员的一个小错误可能引起严重的问题，在被发现前会持续很多天。

14.1.7 引入的细胞系和活组织

由于进入组织培养实验室的细胞系和组织样本可能是污染的，它们应该被隔离（参见 14.1.8 节)，直到可被认为不存在污染后，它们或其衍生物才可以和其他材料一起常规使用。在任何可能的情况下，所有细胞系应该通过一个可信赖的细胞库获得，这样就已经进行了污染筛查。任何其他来源的细胞系，以及所有动物或人类供者来源的活组织，在被排除污染前应该被视为污染。

14.1.8 隔离

任何有污染嫌疑的培养物、任何未经检测的引入材料都应该被隔离。理想状况下，隔离应该在一间有生物安全柜和孵箱的单独房间进行，如果条件不允许，可能要征用一个常用生物安全柜。在这种情况下，该生物安全柜应该是一天中最后使用的物品，并且在使用后用含 2%酚消毒剂的 70%乙醇喷淋和擦拭（咨询你们的安全专员；这一操作可能需要风险评估)，并在当天停止使用该生物安全柜。

14.2 微生物污染的种类

细菌、酵母菌、真菌、霉菌、支原体，以及偶见的原生动物都可能是组织培养的污染物。通

常感染的物种或类型并不重要，除非它频繁出现。仅有必要记录下污染物的一般种类（如杆状菌或球菌、酵母菌等）、它如何被发现、培养物最后处理的地点，以及操作者的名字。如果一个特定种类的感染频繁地反复出现，培养并识别它，并尝试找到其来源可能是有意义的（Hay and Cour，1997），小心将活的污染物远离组织培养设备。大体而言，迅速生长的生物体很少存在疑点，因为它们一般很明显，很快被检测到，而后培养物可被清除。当污染物是隐藏的或太小且在显微镜下观察不到时则比较困难，如支原体或生长缓慢的物种因为水平太低而逃过检测。使用抗生素是隐藏的污染物不能被检出的常见原因（参见12.5.7节）。

14.3 污染物的监控

潜在的污染物来源及避免污染应采取的相应预防措施列于表14.1。即使在最好的实验室也会出现污染，所以推荐下列程序（参见28.5节）。

（1）在每次处理一份培养物时，通过肉眼和显微镜下检查污染状况。每个月检测一次支原体（参见14.3.2节）。

（2）如果一份培养物被怀疑但是没有明确污染，并且不能在原位确定事实，清除生物安全柜或超净台内除可疑培养物和一桶巴斯德移液管外的所有物品。由于对其他培养物存在潜在风险，最好在其他培养物都处理完成后进行。从培养物中取出一份样本，置于一张显微载玻片上。Kova载玻片（Kova International公司）由于不需要盖玻片因此更为方便。用显微镜检查玻片，最好使用相差显微镜。如果确认培养物被污染，清除移液管，用70%乙醇或Virkon擦拭生物安全柜或超净台，当天不再使用该生物安全柜或超净台。

（3）记录污染的性质。

（4）如果污染是新的并且没有传播，清除培养物、用于培养的培养基瓶及其他所有在培养过程中使用的试剂（如胰蛋白酶）。清除上述全部物品并消毒，最好在组织培养区外的通风橱进行。

（5）如果污染是新的并且开始传播（也就是至少在两个不同的培养物中出现），清除全部正在使用的培养基、储存试剂、胰蛋白酶等全部溶液。


彩版16

（6）如果相同种类的污染以前发生过，检查储存试剂是否污染可通过：①单独孵育或与营养肉汤共孵育（见10.6.2节和彩版16d）；②将溶液涂于营养琼脂（Oxoid，BD Bioscience公司）。如果①和②证实为阴性，但是仍怀疑污染，孵育100mL溶液，通过0.2μm滤器过滤，并将滤出液涂于营养琼脂作为未变质对照。

（7）如果污染在传播、为多特异性且反复出现，检查：①实验室的灭菌程序（如烘箱或灭菌锅的温度，特别是灭菌包的中心，灭菌周期的间隔）；②打包和储存的实行（如未密封的玻璃制品，应该每24h重新灭菌一次）；③无菌室和生物安全柜过滤装置的完整性。

（8）不要尝试去除污染，除非培养物不可代替。

14.3.1 可见的微生物污染

微生物污染的特征如下。

（1）pH突然改变，通常在大多数的细菌感染时降低（彩版16a），酵母菌感染时改变很少直到污染变得严重（彩版16c），有时在真菌感染时升高。

（2）培养基浑浊（彩版16a~c），有时在表面出现轻微的薄膜或者泡沫，或在生长表面出现斑点，移动培养瓶时消散（彩版16b）。

（3）在10×物镜下，细菌污染的细胞间空隙会变成颗粒状，并可能会闪动（图14.2a）。酵母菌表现为独立的圆形或卵形颗粒，并可能出芽较小颗粒（图14.2b）。真菌产生稀薄的丝状菌丝（图14.2c），有时产生更密集的孢子团，孢子团可能为蓝色或绿色。毒性感染时会出现细胞死亡。


彩版16

图14.2 污染的种类。污染细胞培养的微生物实例。（a）细菌；（b）酵母菌；（c）霉菌；（d）在特定营养琼脂表面生长的支原体集落；（e）（f）培养细胞表面生长的支原体的扫描电镜图像［（d）~（f），M. Gabridge博士的馈赠；（a）~（c），10×物镜支原体的Hoechst 33258染色（见彩版16e、f）］

（4）在100×物镜下，可能能够识别个体细菌并区分出杆菌和球菌。在放大后，可以发现一些感染中可见的闪动是由细菌迁移引起的。一些细菌会成团或者结合培养的细胞。

（5）通过制备片子，可在 100×物镜下识别细菌的形态，但很少有必要这么做。微生物污染可能会和培养基组分的沉淀或细胞碎片混淆（特别是蛋白质），但是可以通过其一致的形态区分。沉淀可能是透明或球状，形态不同，并且通常大小不一。细菌团可能与沉淀的蛋白质混淆，但是，特别是摇动后，可以见到很多单个或成串的细菌。如果仍有疑虑，取出一份培养基样本接种到营养琼脂（参见 10.6.2 节）。

14.3.2 支原体

除了培养状况恶化外，采用常规显微镜并不容易察觉支原体污染（图 14.2d~f），支原体污染的检出需要荧光染色、PCR、酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫染色、放射自显影术或微生物学分析。采用 Hoechst 33258 进行 DNA 染色（Chen，1977）是最简单和最可信的方法之一（参见方案 14.1），在 50×或 100×目镜下支原体污染可以被显示为细胞质上明确的微粒或丝状染色（彩版 16e、f）。采用这种方法时，培养细胞的细胞核同样被亮染，所以可以作为该染色法的阳性对照。大部分其他微生物污染也可以通过荧光染色检出，所以低水平的污染，或特定的小有机体如球菌也可以被检测到。



彩版 16

方案 14.1 支原体的荧光检测

概要

细胞在无抗生素的条件下培养至少一周，转移培养基上清到对数生长早期的指示细胞培养物中，孵育 3~5 天，固定细胞并染色，观察细胞核外的荧光。

材料

无菌或无菌制备

- 培养上清，无抗生素，来自于 7 天单层细胞培养或离心后的悬浮细胞培养
- 指示细胞（如 3T6、NRK、Vero、A549）
- 培养皿，6cm

非无菌

- Hoechst 33258 染料，50ng/mL 溶于无酚红 BSS（BSS-PR）或 D-PBSA
- BSS-PR：无酚红的 Hanks' BSS
- D-PBSA：无钙离子和镁离子的 Dulbeccos' PBS
- 去离子水
- 固定剂：新鲜配制的乙酸：甲醇（1∶3，冰上）
- 褪色阻燃的缓冲甘油黏附剂（参见附录Ⅰ：支原体试剂）

操作步骤

1. 将指示细胞种入培养板，不加抗生素；种植足够数量使4~5天达到50%~60%细胞汇合（如2×10^4 NRK或1×10^5 A549，5mL培养基）。

2. 加入1.5mL待测培养基。

3. 孵育培养物直到指示细胞到达50%~60%细胞汇合。

注意事项 分析结束时培养物绝不能完全汇合，否则染色会被抑制，并且会影响后面对支原体的直接观察。

4. 移除并弃去培养基。

5. 用BSS-PR或D-PBSA浸洗单层细胞，并弃去洗液。

6. 用新鲜的BSS-PR或D-PBSA对半稀释固定剂，浸洗单层细胞，并弃去洗液。

7. 加入固定剂原液，浸洗，弃去洗液。

8. 再加入固定剂（约0.5mL/cm^2），固定10min。

9. 移除并弃去固定剂。

10. 如果需储存，充分干燥单层细胞（样本可以在该阶段收集，以后再进行染色）。

11. 如果直接进行染色，用去离子水洗掉固定剂并弃去水。

12. 在BSS-PR或D-PBSA内加入Hoechst 33258，室温下染色10min。

13. 去除并弃去染料。

14. 用水浸洗单层细胞，弃去洗液。

15. 加一滴缓冲甘油黏附剂，盖上盖玻片，吸掉盖玻片边缘的多余液体。

16. 用荧光显微镜观察单层细胞，使用330~380nm的激发光滤镜、LP440nm吸收光滤片。

认识到通过细胞或培养基的宏观改变不一定可以显示出支原体的存在是非常重要的。很多支原体污染，特别是在连续培养的细胞株中生长缓慢且并不破坏宿主细胞。但是，它们可以通过很多不同的途径改变培养物的行为和代谢（McGarrity，1982；Doyle et al.，1990；Giron et al.，1996；Izutsu et al.，1996；Paddenberg et al.，1996；Zhao et al.，2008）。例如，由于支原体消耗了培养基中的胸苷，当用［^{3}H］胸苷标记时，感染的培养表现异常（Nardone et al.，1965）（图23.21）。免疫学研究也可能由于支原体污染而完全失败，尝试产生抗细胞表面的抗体时可能得到抗支原体的抗体。因此，非常有必要进行定期分析以检测可能的污染转变，特别是连续培养的细胞株。

监控培养中的支原体 长期支原体污染的表面标记包括细胞增殖减慢、饱和密度下降（Stanbridge and Doersen，1978），以及悬浮培养时出现凝集（Giron et al.，1996）。尽管急性感染会引起全面恶化，但或许会存在少量有抵抗性的集落，这些细胞系及所产生的细胞系也不能摆脱污染，它们可能是慢性感染携带者。

14.3.3 支原体的荧光染色

Hoechst 33258是一种可以特异与DNA结合的荧光染料，用于培养物的染色（Chen，1977）。

由于支原体包含 DNA，它们可以通过特有的颗粒或丝状荧光亮染很容易地被检测到。其一般分布在细胞质或细胞表面，污染严重时也出现在周边区域。单层细胞培养可以直接固定染色，但是更推荐使用指示细胞（即另一个单层生长细胞系），该细胞已明确无支原体污染而且是支原体的适宜宿主，同时其生长良好，有足够的细胞质以显示黏附的支原体，如 MDCK、Vero 细胞、3T6、NRK 或 A549，其中 MDCK 被认为是最佳选择（Volokhov et al.，2008）。悬浮生长的细胞一定需要指示细胞。使用指示细胞也可以富集支原体污染，从而使得它们更易被检出（Volokhov et al.，2008，2011），并可以帮助减少由刚复苏或原代培养的细胞碎片引起的假阳性，避免了无谓的损失，如果仅此一瓶的话，更避免了珍贵培养物丢失。如果有大量碎片存在，培养基可以用 5μm 的无菌滤器过滤或以 100*g* 离心。


彩版 16

分析 检查细胞核外的荧光。支原体会表现为细胞质上或细胞间隙中小点状或丝状荧光（彩版 16e、f）。小点接近 50×物镜的分辨率极限（0.1~1.0μm），一般大小和形状一致。并不是所有的细胞都会被污染，所以在培养物被确认无污染前要尽可能多地观察染色样本。

有时会观察到细胞质均匀的亮染，可能是由 RNA 引起的。这类荧光在储存制备好的样品时会逐渐变暗，在第 2 天（干燥避光保存后）观察可以得到更为清晰的结果。假阳性不会出现清晰的点状或丝状支原体形态。

如果对荧光检测的阐释存在任何怀疑，应该将被测细胞取出部分，在无抗生素存在的情况下再次培养后重复检测。如果结果仍然可疑，采用其他方法再次检测，如 PCR（参见方案 14.2）或 MycoAlert（Lonza）。

方案 14.2 通过 PCR 检测支原体

由德国布伦瑞格 DSMZ（德国微生物菌种保藏中心）的 C C. Uphoff 和 H G. Drexler 提供。

背景

聚合酶链反应（PCR）为在细胞培养中直接检测支原体提供了一种非常敏感和特异的分析方法，其人力、时间和成本消耗少，阐释客观，可重复，并且便于记录结果。已经报道了多个引物可用于单一和巢式 PCR、支原体或真细菌菌种精确或广谱的检测。在大多数情况下，16S rDNA 序列由于含有或多或少的保守序列区而被用作靶序列。该基因也为进行 16S rDNA 的 PCR 或进行 16S rRNA 的 cDNA 的 RT-PCR（反转录酶 PCR）检测提供了机会。

在这里我们描述了寡核苷酸混合物用于支原体的特异性检测。这一方法显著减少了用于样品制备和进行 PCR 的溶液，以及其他原料可能污染而引起的假阳性结果的产生。采用细胞培养的样本进行 PCR 反应的一个主要问题是 *Taq* 聚合酶可能被未知组分所抑制。为了评估这些抑制剂，我们强烈建议样本 DNA 的提取和纯化采用常规酚氯仿抽提、盐沉淀方案或更方便的过柱或基质结合抽提法进行。

为了保证样本制备和 PCR 不出现失误，PCR 应包含适当的对照反应。这包括了每个样本反应的内参 DNA、平行的阴性和阳性对照，以及水对照反应。内参由含有同样引物序列的 DNA 片段组成，序列可以扩增但是片段大小不同于支原体污染样本的扩增子。对照 DNA 以预先设定的有限稀释法加入 PCR 混

合物，以证实 PCR 反应的敏感性。内参 DNA 可以从作者处索取。PCR 反应的进行很大程度上依赖于采用的 *Taq* 聚合酶、缓冲液和设备。所以方案可能需要进行个别调整以达到最佳的状况。该调整可以通过一系列阳性或内参对照 DNA 的稀释进行。

概要

收集贴壁细胞或去除细胞的悬浮培养培养基上清，通过离心分离细胞组分。在洗涤步骤后，提取 DNA，取一等份加入支原体特异的寡核苷酸用于核酸扩增。适当的阳性和阴性对照反应保证 PCR 的无错运行，且确保了 PCR 的敏感性。扩增的产物在溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶中显像，然后记录。

材料

- D-PBSA（磷酸盐缓冲溶液）：137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，8.1mmol/L Na_2HPO_4，1.5mmol/L KH_2PO_4，pH 7.2，121℃高压 20min 灭菌
- TAE（磷酸三乙酸 EDTA），50×2mol/L 三羟甲基氨基乙烷（Tris base），5.71%冰醋酸（*V*/*V*），100mmol/L EDTA，调 pH 至 8.5
- DNA 提取和纯化系统，如酚氯仿抽提和乙醇沉淀，或盐沉淀法或 DNA 结合基质法的 DNA 抽提试剂盒
- *Taq* DNA 聚合酶配合适合的 10×缓冲液（Platinum 热启动 *Taq* 聚合酶；Invitrogen，10×无钙镁缓冲液）
- 上样缓冲液，6×：10mmol/L Tris-HCl（pH 7.6），0.03%（*w*/*V*）溴苯酚蓝，0.03%（*w*/*V*）二甲苯靛蓝，60%甘油（*V*/*V*），60mmol/L EDTA
- 引物：

  5′引物（Myco-5′）

  cgc ctg agt agt acg twc gc
  tgc ctg rgt agt aca ttc gc
  crc ctg agt agt atg ctc gc
  cgc ctg ggt agt aca ttc gc

  3′引物（Myco-3′）

  gcg gtg tgt aca ara ccc ga
  gcg gtg tgt aca aac ccc ga

  （r＝g 和 a 混合；w＝t 和 a 混合）

引物储存液：100μmol/L 的 dH_2O 溶液在–20℃冷冻储存。工作液为 dH_2O 混入各 5mmol/L 的上游引物（Myco-5′）和各 5mmol/L 的下游引物（Myco-3′），分装成小只（即每只 25~50μL），在 20℃冷冻储存。

- 内参 DNA：内参可以按照其他文献（Ophoff and Drexler，2002）进行制备或从作者处获得。应该通过对一系列稀释比例的内参 DNA 进行 PCR 以决定浓度限值
- 阳性对照 DNA：按照下述方法制备 10 倍浓缩的支原体阳性样本，也可以从作者处获得
- 脱氧核苷酸三磷酸盐混合物(dNTP 混合物)：混合物包含各 5mmol/L 的脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸（dCTP）、脱氧鸟苷三磷酸（dGTP）和脱氧胸苷三磷酸（dTTP），5mmol/L 的水溶液分装到 50μL 储存在–20℃
- 氯化镁（50mmol/L）
- 琼脂糖，1.3% TAE 胶

- 热循环机

操作步骤

A. 样本的收集和DNA的制备

1. 在收集样本前，用于检测支原体污染的细胞系应在不加抗生素的条件下培养数天，或在复苏后培养细胞至少2周。这样可以确定培养基上清内的支原体浓度在PCR分析的限制浓度范围内。

注意事项 用被测细胞的培养上清培养指示细胞（如MDCK），可增加支原体的滴度。

2. 收集1mL贴壁细胞的培养基上清或去除细胞的悬浮培养基上清。通过这种方法收集的样本可能含有一些活细胞和（或）死细胞，其有利之处在于，有些支原体菌种主要黏附甚至侵入真核细胞。培养基上清可在4℃储存多天或在–20℃储存数周。在复温后，样本应该马上处理。

3. 将培养基上清以13 000*g*离心5min，用1mL D-PBSA重悬沉淀，涡流混匀。

4. 将悬液以13 000*g*再次离心5min，并按照步骤3用D-PBSA再洗一次。

5. 离心后，用100μL D-PBSA重悬沉淀，涡流混匀，然后加热到95℃，保持15min。

6. 在细胞溶解后，马上按照标准酚/氯仿抽提和乙醇沉淀法，或其他DNA分离方法提取和纯化DNA。

B. PCR反应

应该严格遵守为了避免DNA交叉污染而设定的规则：①固定DNA提取、PCR反应和PCR反应后跑胶的地点，并将彼此分隔；②将所有试剂分装储存，以持续提供未经污染的试剂；③避免再扩增；④储存专门用于PCR的移液管、枪尖和离心管，并且经常用紫外线照射移液管；⑤严格按照下文的描述设置PCR程序；⑥在整个样本制备和PCR设置过程中佩戴手套；⑦引入适当的对照反应，如内参、阳性、阴性和水对照反应。

1. 按照如下配方为每个待测样品配制两份反应预混液。

　(a) 仅样本：1μL dNTP，0.5μL Myco-5′，0.5μL Myco-3′，2.5μL 10×PCR缓冲液，1μL $MgCl_2$，0.2μL热启动*Taq* DNA酶，17.3μL dH_2O。

　(b) 样本和DNA内参标准品：1μL dNTP，0.5μL Myco-5′，0.5μL Myco-3′，2.5μL 10×PCR缓冲液，1μL $MgCl_2$，0.2μL热启动*Taq* DNA酶，16.3μL dH_2O，1μL内参对照DNA。准备足够量的预混液以用于多个样本、3份额外的样本、包括额外的3个不含有内参DNA的对照反应（阳性、阴性和水对照）和额外的2个含有内参DNA的对照反应（阳性和阴性对照），以及为移液损失预留的液体。

2. 将23μL各预混合储存液分别加入0.2mL PCR反应管，向水对照反应管内加入2μL UPW。

3. 将用于配制预混合储存液的试剂放回原位。

4. 取出待测DNA样本，而后取出阳性对照DNA。不要同时操作试剂和样本。

5. 向每个不含内参DNA的管内加入2μL制备好的DNA，而后向含有内参DNA的管内加入2μL制备好的DNA。

6. 将反应混合物转移到热循环机以进行PCR，按照如下参数进行一个热循环：第一步，95℃，7min；第二步，72℃，3min；第三步，65℃，2min；第四步，72℃，5min。

7. 在初始循环活化了*Taq*酶后，按照如下参数进行32个热循环：第一步，95℃，4s；第二步，65℃，8s；第三步，72℃，16s；每个循环间加1s的延期。

8. 在最后一个扩增步骤的72℃维持10min结束反应，而后冷却样品到室温。

9. 制备含有0.3μg/mL溴化乙锭的1.3%琼脂糖-TAE胶。将胶浸入1×TAE（三羟甲基氨基甲烷+冰醋酸+EDTA）并在每个孔加入12μL扩增后产物（10μL反应混合物加2μL 6×上样缓冲液），以10V/cm跑胶。

10. 用合适的紫外线屏为特定产物成像，并记录结果。

14.3.4 PCR法检测支原体

虽然微生物培养仍然是支原体污染的标准检测，但是PCR方法已经显示出了包括敏感和更短的检测时间在内的显著优势，尽管检测到灭活的支原体可能导致该方法产生假阳性结果（Volokhov et al.）。现在已经有多个支原体检测PCR试剂盒（表14.2）。除了配套提供的阳性对照，这些试剂盒最好使用一系列支原体DNA对照样本以比较其敏感型。

结果的阐释

（1）理论上，所有样本含有内参DNA，显示为986bp的条带。如果第二次PCR后依然没有显示出样本和内参条带，需要重复所有的步骤。

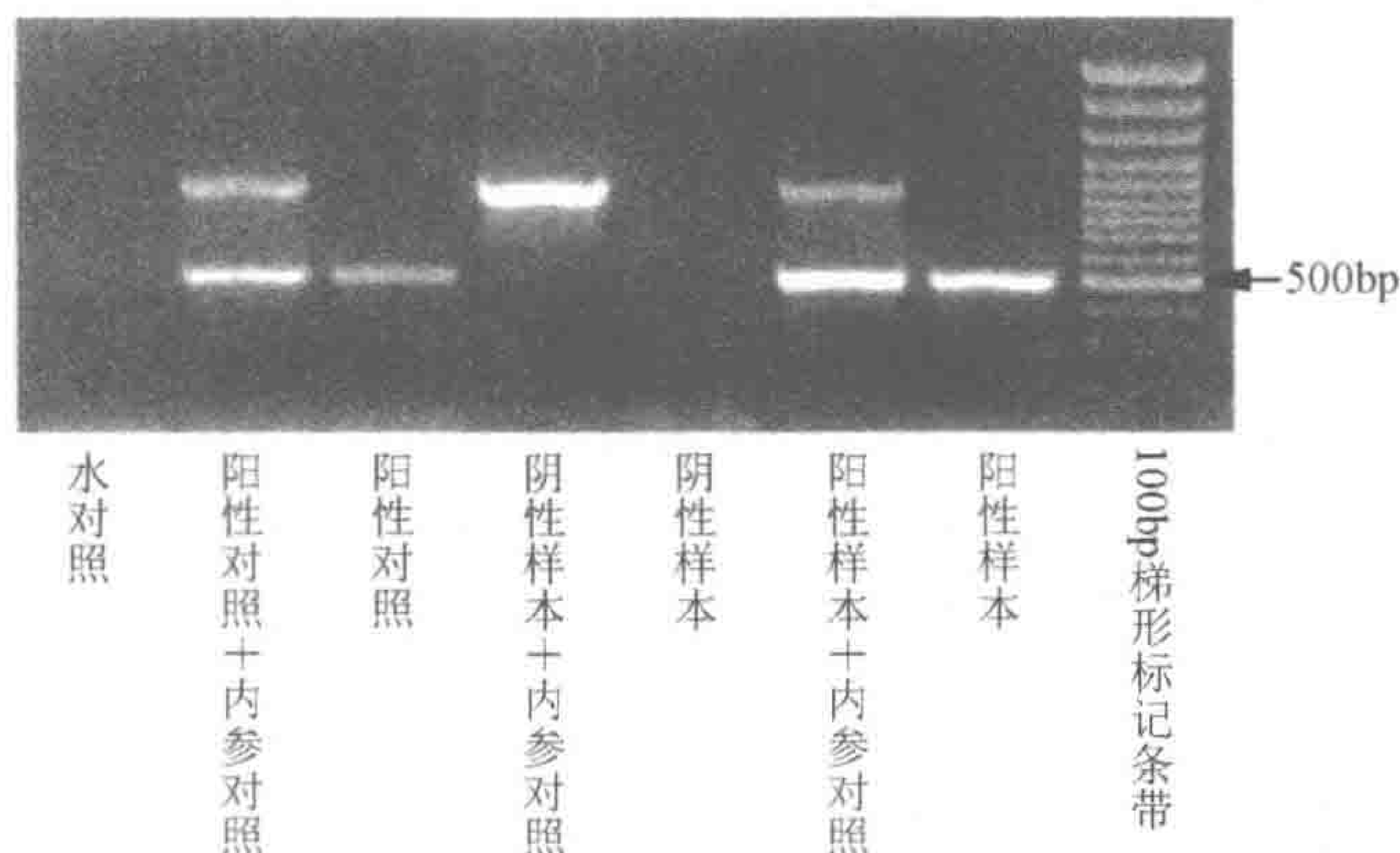


图14.3 通过PCR检测支原体。感染、未感染和对照细胞的PCR产物溴化乙锭荧光电泳图，1.3%琼脂糖。100bp梯形条带包括如下条带：100bp、200bp、300bp、400bp、500bp（强染条带）、600bp、700bp、800bp、900bp、1031bp、1200bp、1500bp、2000bp和3000bp。野生型支原体条带大约510bp，内参对照条带接近1000bp（来自DSMZ的Cord Uphoff的馈赠）

（2）支原体阳性样本显示出一条502~520bp的条带，具体数值取决于支原体的类型（图14.3）。

（3）试剂被支原体特异的DNA或PCR产物污染显示为水对照和（或）阴性对照样本出现条带。在细胞培养体系中加入抗支原体试剂以消除感染的支原体或常规加入抗生素后，会出现弱的支原体特异条带。在这种情况下，阳性反应可能来自于培养基中残留的支原体死细胞或浓度很低的支原体活细胞。

由于16SRNA基因的高度保守区的存在，可以选择广泛特异性的引物（“通用引物”），不仅可以与任何支原体DNA反应，甚至可与其他原核DNA反应，也可以选择支原体特异性更高的引物（Uphoff and Drexler，1999）。不发生与细胞系DNA的交叉反应非常重要。扩增过程通常为一个单步骤PCR，但是当需要更高的敏感性和特异性时，也可以考虑巢式PCR。由于样本中有大量的衍生物存在，通常在常规诊断中不需要很高的敏感度级别。PCR的高敏感度可能由于污染了靶DNA而引起假阳性结

果。另一个可能的问题是假阴性数据，由样本成分抑制 *Taq* 酶活性引起。该问题可以通过进行样本DNA 制备和向样本内插入内参 DNA（参见方案 14.2）解决。采用内参 DNA 的有限稀释法可以很容易地将 PCR 反应标准化。理论上，内参与野生型支原体 DNA 片段用同样的引物进一步扩增。对常见 PCR 的进一步升级方法是实时定量（real-time）PCR。该技术利用绿色 SYBR 用于检测扩增的 DNA或第三淬火荧光标记的寡核苷酸，可以特异性地和来自于支原体 DNA 的扩增产物杂交。如果采用绿色 SYBR，需要进行溶解度测定以在非特异的扩增子中区分支原体特异的扩增。可在任何实验室进行检测的 PCR 方案（Uphoff and Drexler，1999），以及多个 PCR 试剂盒都可以购买得到（表 14.2）。

表 14.2　支原体检测试剂盒

试剂盒	原理	供应商
MycoAlert	支原体特异性酶 ATP 的发光检测	Lonza
Mycotect	由 6-甲基嘌呤脱氧核酸降解为 6-甲基嘌呤产生的细胞毒性	Invitrogen
ELISA	用 *M. hyorhinis*、*M. arginine*、*M. fermentans*、*M. orale*、*M. pirum*、*M. hominis*、*M. salivarium*、*A. laidlawii* 的多克隆抗体进行 ELISA 分析	Roche
PCR	16S rRNA 的 PCR	AppliChem
		Stratagene
		PAA
	16S rRNA 的 PCR 和实时定量 PCR	Promokine
		Autogen Bioclear
		Minerva Biolabs
		Sigma
PCR-ELISA	16S rRNA 的 PCR，而后通过 ELISA 检测扩增产物	Roche
MycoProbe	用比色法在 *M. hyorhinis*、*M. arginine*、*M. fermentans*、*M. orale*、*M. pirum*、*M. hominis*、*M. salivarium*、*A. laidlawii* 检测生物素标记的 16S rRNA 探针	R&D
Mycoplasma Tissue Culture NI	DNA-RNA 杂交吖啶酯标记的 DNA，而后通过化学发光测定 DNA-RNA 混合物	Gen-Probe
ImmuMark	单克隆抗体的免疫荧光分析	MP Biochemicals

注：表格由 Cord Uphoff 惠赠

14.3.5　检测支原体的替代方法

微生物培养　这是一个非常敏感的方法，广泛用于质量控制和检验程序。然而，该方案的展开需要独立的设备和适当的微生物学经验背景，因为这些微生物体很难培养，而且需要培养活支原体作为阳性对照。培养的细胞种入支原体液体培养基（Doyle et al.，1990）（BD Bioscience 公司），生长 6 天，而后接种到特殊营养琼脂表面（Hay，2000）（BD Bioscience 公司；Sigma-Aldrich 公司）。约 8 天形成克隆，并可以通过其大小（直径约 200μL）和中心高密度、周边低密度的“煎鸡蛋”形态特征识别（图 14.2d）。支原体检测试剂盒和通过微生物培养检测支原体是可行的（表 14.2；同时参见补充材料中的附录III）。微生物培养法仍然是一个已经认可的工业标准法，但是耗时很长并且操作远难于荧光技术或 PCR，最好将用于阳性对照的活支原体交给具备专业隔离设备的专门实验室处理。当确定污染后，可以采用特异的单克隆抗体定性支原体（Roche 公司；参见下文的免疫学分析）。

生物化学　在已报道的支原体污染检测方法中，有些方法检测支原体特异的酶，如精氨酸脱氨酶或核苷磷酸化酶（参见 Schneider and Stanbridge，1975；Levine and Becher，1977），有些检

测6-甲基嘌呤脱氧核酸的毒素（Mycotect，Life Technologies公司）。然而，这些方法被发现会出现假阴性结果，不应单独用于支原体检测分析（Uphoff et al.，1992）。MycoAlert系统（Lonza公司）检测来自于精氨酸水解和碳水化合物发酵支原体过程中活化的氨基甲酯酶和（或）乙酸酶的ATP。由于这些酶在很多其他细菌中也存在，该检测并不完全特异。培养上清中的酶活性通过荧光素酶的发光检测。该检测据称非常敏感和快速（30min）（Mariotti et al.，2008）。

分子杂交 支原体DNA特异的分子探针可通过常规分子杂交技术用于感染的检测。已经有直接可用的试剂盒，使用生物素标记的探针和抗生蛋白链霉素，通过酶放大法步骤以产生比色法终点（Mycoprobe，R&D公司）。Mycoplasma Tissue Culture NI（MTC-NI，Merck Millipore公司）是一个高敏感性和特异性的检测方法，使用与支原体16S rRNA和23S rRNA序列同源的吖啶酯标记的单链DNA探针。在rRNA从有机体中解离后，化学发光标记的DNA探针结合靶rRNA以形成稳定的DNA-RNA杂交，而后加入水解缓冲液以破坏单链非杂交探针的吖啶酯。然后用光度计检测阳性信号。分析可在1h内完成。

免疫学分析 免疫学方法使用支原体特异的多克隆或单克隆抗体以检测支原体。抗体一般应用为免疫荧光（Immumark Mycotest试剂盒，MP Biochemicals公司）和酶联免疫吸附法测定（ELISA，如Creative Diagnostics公司）。物种特异的免疫学分析也可用于支原体菌种的识别。当仅有特定菌种存在时，免疫学分析在支原体检测中曾产生假阴性结果。例如，Roche公司的支原体检测盒不能检测出*M. fermentans*——细胞培养时最常见的支原体菌种之一（Uphoff et al.，1992）。已生产的一个单克隆抗体CCM-2可识别一个存在于大部分支原体的常见抗原（延长因子TU）（Immumark Mycotest，MP Biochemicals公司）。染色比荧光染料染色特异性更高，并可以直接用于待测细胞而不需要指示细胞的培养。但是，对于染色的阐释可能主观并且很难由不同的观察者重复观察。

14.3.6 支原体检测服务

大部分的细胞库（参见表15.5和补充材料中的附录III）提供支原体检测服务，采用的方法包括微生物培养、DNA荧光染色、PCR或三者结合进行。可疑的培养物可以送到上述单位进行付费检测。送待检样本时，一定要注意：①确定标记样本可能受到支原体污染；②不要送出恶化晚期的培养物，否则在样本送达时细胞有可能已经全部死亡，这意味着支原体也可能都死亡，从而得到假阴性结果。

14.3.7 病毒污染

当前人们对培养中的细胞系可能被病毒感染的防范意识正在逐渐增加（Uphoff et al.，2010；Sfanos et al.，2011）。引入细胞系、天然产品，如培养基中的血清和用于传代的酶，如胰蛋白酶，都是潜在的病毒污染来源。感染的组织供者或者感染的操作者也可能会感染培养物，另外，培养物本身，例如，人类肿瘤细胞在通过免疫缺陷动物宿主传代过程中，可能会从宿主感染病毒（Sfanos et al.，2011）。很多试剂在生产时已经进行了一定范围内的病毒筛查，并且声称在处理过程中较大病毒都已经被滤去，但是目前还没有确定的方法可以排除病毒污染。避免污染最好的办

法是确定产品来自于没有感染已知病毒的动物。因此，除非有设备和时间进行内部病毒检测，否则需要依赖供应商进行恰当的质量控制。

病毒污染的检测 用一组抗体通过免疫染色（参见方案 18.6）或 ELISA 分析（Uphoff et al.，2010）筛查是检测病毒感染的一种方法。也可以使用 PCR 法（Schmitt and Pawlita，2009；Uphoff et al.，2010）。一些商业公司（如 BioReliance 公司）提供病毒检测。

14.4 污染培养物的处理

保证所有污染物质正确处理非常重要。培养容器应从培养区移走，如果可以的话不打开，并高压灭菌。清理物品，如带盖培养皿、移液管或其他与污染培养物接触的物品应浸入次氯酸盐杀菌消毒剂（如 Prespt，Fisher Scientific 公司或 Medisave 公司）；培养皿应在浸入时打开。如果一系列类似的培养仅出现一例污染，只需要清除用于该培养物的培养基；但是如果污染广泛分布，那么所有用于这些细胞的培养基及所有其他储存溶液和试剂都应该用次氯酸处理。

14.5 污染的去除

14.5.1 细菌、真菌和酵母菌

由于处理培养物可能不成功或导致发展出耐抗生素的微生物，因此清除微生物污染最可信的方法是丢弃培养物及用于培养的培养基和试剂。应仅在极端状况下尝试消除污染，保持隔离并由专家监控。如果不成功，培养物和相关试剂应该在失败出现后立刻灭菌。

一般的规则是丢弃污染的培养物，不尝试去除污染，除非保留的细胞种至关重要。在任何情况下，完全去除污染都是非常难的，特别是酵母菌，并且尝试后可能得到更强的抗生素抗性菌种。详见方案 14.3。

方案 14.3 微生物污染的去除

概要

通过浸洗单层细胞或离心重悬非贴壁细胞，用高浓度抗生素多次洗涤培养物。而后再次接种培养，3 份含抗生素，3 份不含抗生素。每次再培养后进行污染检测。

材料

无菌

- DBSS（参见附录Ⅰ：解离 BSS）
- 高浓度抗生素培养基（参见附录Ⅰ：收集培养基；支原体部分见 14.5.2 节）
- 再培养材料（参见方案 12.3）

非无菌

- 显微镜，最好带有40×和100×相差物镜
- 支原体染色的材料（参见方案14.1）
- 用于清理的消毒剂（参见6.8.6节）

操作步骤

1. 小心收集污染培养基。如果可能，应检测微生物对特定抗生素的敏感范围。如果不可行，将培养基灭菌或加入消毒剂。
2. 用DBSS洗细胞（稀释污染物）：
   (a) 对于单层细胞，用DBSS浸洗培养物3次，胰蛋白酶消化，通过离心重悬用DBSS再洗细胞2次；
   (b) 对于悬浮培养，通过离心重悬用DBSS洗培养物5次。
3. 在新培养瓶以最低可行种植密度再接种。
4. 加入高浓度抗生素培养基，每2天换液。
5. 用高浓度抗生素培养基再培养。
6. 重复步骤1~4，进行3次再培养。
7. 去掉抗生素，在无抗生素培养细胞的状况下再进行3次再培养。
8. 通过相差显微镜检查培养物并进行Hoechst染色（参见方案14.1）。
9. 在无抗生素的条件下再培养细胞2个月，检查确定所有污染已被清除（参见10.6.2节）。

14.5.2 支原体的消除

如果在培养物中检测到支原体污染，首先也是最重要的规则，与其他类型的污染一样，是培养物应该被清除即灭菌或焚化。在例外的情况下（如污染的细胞系是不能取代的），可以尝试去除培养物的污染。然而，去污染应该只能由经验丰富的操作者完成，并且工作必须在隔离的状况下展开，以避免污染其他无支原体的培养细胞。详见方案14.4。

方案14.4 支原体污染的去除

由德国布伦瑞格DSMZ（德国微生物菌种保藏中心）的C C. Uphoff和H G. Drexler提供。

背景

多种试剂具有抗支原体活性，包括卡那霉素、庆大霉素、泰乐菌素（Friend et al.，1966）、多茴香脑磺酸（Mardh，1975）、5-溴尿嘧啶结合Hoechst 33258和紫外线（Marcus et al.，1980）。由于一些支原体菌种会侵入真核细胞（如*M. fermentans*），去菌过程必须同时包括细胞内和细胞外的支原体。因此，现有最成功的制剂有抗支原体的大环内酯类抗生素（如泰妙菌素）、氟喹诺酮类药物（如环丙沙星、恩诺沙星、

司帕沙星）和四环素（如二甲胺四环素、强力霉素）（Uphoff and Drexler，2002）。已经有多个产品直接用于细胞培养，如MRA（Mycoplasma Removal Agent，MP Biomedicals公司）、BM-Cyclin（Roche公司）或Plasmocin（Invivogen公司），这些抗生素可以单独使用或联合治疗。最近研发的膜活性多肽也单独或与其他抗生素联合投入使用。当血清存在时，阿拉霉素、dermaseptin B2、短杆菌肽S和表面活性素脂肽抗生素抗支原体的活性降低，所以在应用时应该不加血清或减少血清浓度到5%或以下。Lonza公司（MycoZap）和Minerva Biolabs公司（Mynox Gold）有试剂盒可用。

细胞培养中的支原体污染抗生素治疗效率很高，大约3/4（约75%）的培养细胞采用上述一种抗生素即可被治愈。而后，残留的支原体菌种可采用其他类型的抗生素杀灭。然而，仍会有支原体菌种残留，并且由于抗生素的细胞毒作用，培养物受损。因此，最好备有多种不同种类的抗生素可被选择应用。预防性应用抗生素可能导致耐药支原体菌种的选择性生长，所以并不推荐。污染的培养物应该按照推荐的浓度和治疗时间，采用表14.3中提到的抗生素，如方案14.3所述进行治疗。但是除非真正必要，否则不要开始该操作，即使必须进行，也应由经验丰富的人员隔离开展（Uphoff and Drexler，2004，2011）。丢弃被污染培养物更加安全。

表14.3 适用于从细胞培养去除支原体的抗生素治疗

商品名	通用成分名	抗生素类型	典型终浓度	治疗周期
Baytril	恩诺沙星	氟喹诺酮	25μg/mL	1周
Ciprobay	环丙沙星	氟喹诺酮	10μg/mL	2周
MRA	保密	氟喹诺酮	0.5μg/mL	1周
Zagam	司氟沙星	氟喹诺酮	10μg/mL	1周
Plasmocin	1．保密 2．保密	氟喹诺酮 蛋白合成抑制剂	25μg/mL	2周
BM-Cyclin	1．泰妙菌素 2．二甲胺四环素	大环内酯物 四环素	10μg/mL 5μg/mL	3周
MycoZap	1．保密 2．保密	膜活性肽 —	— —	3代
Mynox Gold	1．表面活性素 2．保密	膜活性肽 —	— —	1代 3代

注：表格由Card Uphoff惠赠

通过浸洗单层细胞或离心重悬非贴壁细胞，用培养基或D-PBSA清洗培养物多次。而后加抗生素培养1~3周，再不加抗生素培养至少2周。在治疗培养后检测污染。

材料

无菌

- 细胞培养特定培养基
- D-PBSA
- 抗生素（浓度参见表14.3）
- 再培养材料（参见方案12.3）

非无菌

- 显微镜，最好带有 40×和 100×相差物镜
- 支原体检测材料（参见方案 14.1 和方案 14.2）

操作步骤

1. 小心收集污染培养基，灭菌或加入次氯酸（参见 14.4 节）。

2. 用培养基或 D-PBSA 洗涤细胞（稀释可以减少污染物数量，每次洗涤 2 个数量级，除非污染物附着于细胞）。

  (a) 对于单层细胞，用 D-PBSA 浸洗培养物 3 次，胰酶消化，而后用 D-PBSA 离心重悬再洗涤细胞 2 次。

  (b) 对于悬浮细胞，用 D-PBSA 离心重悬洗涤细胞。

3. 以高种植密度接种 1 个或多个新培养瓶。

4. 按照推荐浓度加入抗生素溶液（表 14.3），每两天更换培养基。

5. 按照推荐时间用含抗生素培养基再次培养（表 14.3）。如果不同类型的抗生素与 BM-Cyclin 交替使用，细胞应在应用新抗生素前换液。

6. 去除抗生素，在无抗生素的条件下培养细胞至少 2 周。

7. 用 PCR 或其他支原体检测方法检测培养物（参见方案 14.1 和方案 14.2）。

8. 不加抗生素再培养细胞 2 个月，检测以确定所有污染已被清除（参见 10.6.2 节）。

14.5.3 清除病毒污染

目前还没有可信的方法可以清除培养物中的病毒；丢弃或容忍是仅有的选择。

14.5.4 顽固污染

很多实验室都经历过一些污染似乎很难通过表 14.1 推荐的方法救治的时期。这个问题没有简单的解决方法，只能以符合逻辑和辩证分析的方式遵守上述的推荐建议，并要特别注意技术的改变、新产品、新供应商、新仪器、生物安全柜或其他仪器不适当的维护（参见 28.5 节）。通常，污染率的增加主要来自于无菌技术不合格，而其他常见因素包括大气中孢子计数增加、孵箱维护不当、污染的冷藏室或冰箱、灭菌烤箱或高压锅故障、无菌包裹不严或灭菌周期监控失控。

持续使用抗生素也会导致慢性污染的发生。很多微生物被抗生素抑制，但没有被杀死。它们会在培养体系中存留，大部分时间检测不到，但当条件改变时会再次出现。让培养物至少一部分时间处于无抗生素的环境非常必要（图 12.9），最好完全不加抗生素，否则隐含的污染会存留，很难测定其来源，并且不可能去除。

操作中的一个小改变、引入新的人员或活动增加如更多人员使用同一设备都可能导致污染概率增加。操作程序必须严格保持，即使操作者不明确原因，且不应轻易改变程序。如果保持严格操作，污染可能没有被完全清除，但是会明显减少且被及早发现。

14.6 交叉污染

细胞系，特别是新建细胞系的交叉污染依然是一个严重的问题（参见13.1节）。由于违规操作和不清晰记录的双重作用，该问题已经导致超过450个细胞系（ICLAC）的错误识别。类似于支原体污染，错误识别不总是显而易见的，所以严格的操作程序必须落实到位以避免其发生（参见13.1.3节）；监控细胞以保证该事件不会发生（参见13.1.4节）。

14.7 结论

- 通过普通和相差显微镜经常检查活培养物的污染状况，通过固定制片荧光染色或PCR检测支原体。
- 不要让培养物长期处于抗生素中。每个细胞系每次至少有一组细胞不添加抗生素，至少培养2周，最好持续不添加抗生素，以使隐藏的污染表现出来。
- 对所有新引入实验室的细胞系进行检疫，直至确定它们没有污染。
- 不要尝试去除培养物的污染，除非该培养物不可替代，则在严格隔离的条件下进行。
- 不要在细胞系间或操作者间共用培养基或其他试剂，并且经常检查细胞系的特征（参见18.3节），以避免交叉污染。
- 新细胞系应该被定性，最好通过DNA基因谱，在分离后尽快进行（参见方案13.1和ASN-0002，[2010]）。

参考文献

Chen TR (1977). *In situ* detection of mycoplasm contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.* **104**:255.

Doyle A, Morris C, Mowles JM (1990). Quality control. In DoyleA, HayR, KirsopBE (eds.), *Animal cells, living resources for biotechnology*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, pp. 81–100.

Friend C, Patuleia MC, Nelson JB (1966). Antibiotic effect of tylosine on a mycoplasma contaminant in a tissue culture leukemia cell line. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**:1009.

Giron JA, Lange M, Baseman JB (1996). Adherence, fibronectin-binding and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human-cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* **64**:197–208.

Hay RJ (2000). Cell line preservation and characterization. In MastersJRW (ed.). *Animal cell culture, a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 95–148.

Hay RJ, Cour I (1997). Testing for microbial contamination: Bacteria and fungi. In DoyleA, GriffithsJB, NewallDG (eds.), *Cell and tissue culture: Laboratory procedures*. Chichester, UK: Wiley, Module 7A:2.

Izutsu KT, Fatherazi S, Belton CM, Oda D, Cartwright FD, Kenny GE (1996). Mycoplasma orale infection affects K and Cl currents in the HSG salivary gland cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **32**:361–365.

Levine EM, Becker BG (1977). Biochemical methods for detecting mycoplasma contamination. In McGarrityGT, MurphyDG, NicholsWW (eds.), *Mycoplasma infection of cell cultures*. New York: Plenum Press, pp. 87–104.

Marcus M, Lavi U, Nattenberg A, Ruttem S, Markowitz O (1980). Selective killing of mycoplasmas from contaminated cells in cell cultures. *Nature* **285**:659–660.

Mardh PH (1975). Elimination of mycoplasmas from cell cultures with sodium polyanethol sulphonate. *Nature* **254**:515–516.

Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F (2008). Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leuk. Res.* **32**:323–326.

McGarrity GJ (1982). Detection of mycoplasmic infection of cell cultures. In MaramoroschK (ed.), *Advances in cell culture*, Vol. **2**. New York: Academic Press, pp. 99–131.

Nardone RM, Todd G, Gonzalez P, Gaffney EV (1965). Nucleoside incorporation into strain L cells: Inhibition by pleuropneumonia-like organisms. *Science* **149**:1100–1101.

Paddenberg R, Wulf S, Weber A, Heimann P, Beck L, Mannherz HG (1996). Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. *Eur. J. Cell Biol.* **71**:105–119.

Schmitt M, Pawlita M (2009). High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations. *Nucleic Acids Res.* **37**(18):e119.

Schneider EL, Stanbridge EI (1975). A simple biochemical technique for the detection of mycoplasma contamination of cultured cells. *Methods Cell Biol.* **10**:278–290.

Sfanos KS, Aloia AL, Hicks JL, Esopi DM, Steranka JP, Shao W, Sanchez-Martinez S, Yegnasubramanian S, Burns KH, Rein A, De Marzo AM (2011). Identification of replication competent mu-

rine gammaretroviruses in commonly used prostate cancer cell lines. *PLoS ONE* **6**(6):e20874.

Stanbridge EJ, Doersen C-J (1978). Some effects that mycoplasmas have upon their injected host. In McGarrityGJ, MurphyDG, NicholsWW (eds.), *Mycoplasma infection of cell cultures*. New York: Plenum Press, pp. 119–134.

Uphoff CC, Denkmann SA, Steube KG, Drexler HG (2010). Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in human and other primate cell lines. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**:904767.

Uphoff CC, Drexler HG (1999). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by PCR analysis. *Hum. Cell* **12**:229–236.

Uphoff CC, Drexler HG (2002). Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **38**:86–89.

Uphoff CC, Drexler HG (2004). Elimination of mycoplasma from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol. Med.* **88**:327–334.

Uphoff CC, Drexler HG (2011). Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol. Biol.* **731**:105–114.

Uphoff CC, Gignac SM, Drexler HG (1992). Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods* **149**:43–53.

Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE (2011). Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol. Cell Probes* **25**(2–3): 69-77.

Volokhov DV, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE (2008). Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5383–5391.

Zhao H, Dreses-Werringloer U, Davies P, Marambaud P (2008). Amyloid-beta peptide degradation in cell cultures by mycoplasma contaminants. *BMC Res. Notes* **1**:38.

（李康华 译）

第15章

冻存和建库

当细胞培养技术一旦在某一实验室建立，它可能产生或者需要大量的细胞系。每一株细胞系的使用都丰富了其起源，使得每一株细胞系成为很宝贵的资源。如果来源很稀有，该细胞系很可能无法再获得，就算可以再获得，也将是昂贵且耗时的。因此，非常有必要通过保存细胞系对这一重要资产进行保护。

15.1　冻存的意义

由于早期传代培养的筛选（参见2.7.2节）、有限细胞系易发生衰老（参见2.7.3节，22.1节；短篇综述22.1），以及持续培养细胞系基因和表型的不稳定性（参见19.1节、22.2节），持续培养中的细胞系容易发生变异。此外，即使在运行得最好的实验室也容易出现设备故障和污染。交叉污染和鉴定错误（参见13.1.1节，表12.2）也高频地持续发生（Capes-Davis et al.，2010；ICLAC）。因此，诸多理由表明有必要对已鉴定的细胞进行冻存，这些理由归纳如下。

（1）基因不稳定性引起的基因型漂变。

（2）细胞系的衰老及其导致的消亡。

（3）生长特征的转化和恶性相关特性的获得。

（4）筛选和去分化引起的表型不稳定。

（5）微生物引起的污染。

（6）其他细胞系的交叉污染。

（7）操作不慎造成的鉴定错误。

（8）培养箱故障。

（9）停止培养未被使用的细胞系以节省时间和物资。

（10）分散给其他使用者。

15.2　冻存前的注意事项

冻存细胞系之前，需要满足一些特定的要求（表15.1）（Parker，2011）。这些涉及细胞培养

所处的时期（原代、有限细胞系、连续细胞株等）、培养条件的确定、细胞系鉴定（参见13.1节）、该细胞系的性能特征（参见18.1节）及其使用寿命的估算，这些将决定其保存的规模。

表15.1 冻存前的要求

状态	有限细胞系	早期冻存（<5代）
	连续培养细胞系	克隆、筛选和定性；扩增培养
标准化	培养基	选择最适培养基并适应该培养基
	血清（如果使用）	所有培养阶段选用同一批次（参见8.6.1节）
	基质	统一种类及供应商，但无需统一大小和形状
鉴定	来源	详细记录来源、生命史和特性
	认证	对比来源和出处，核对细胞系的特征（参见13.1节~13.4节）
	转化	确定转化状态（表22.1）
	污染	微生物（参见14.3节、10.6.2节）
		支原体（参见方案18.1、18.2）

15.2.1 鉴定

细胞系的培养历史和现有特点应该被记录下来（参见18.3节），尤其是那些使该细胞系独特且珍贵，以及在冻存期容易被遗忘的特殊性质。冻存之前，细胞系应该未被污染（参见14.3节）并且其特征信息应明确可信（参见13.1.4节）。尽管一些小量的、新获得的细胞系可能在冻存前没进行全面的鉴定（参见15.2.2节），但在进行大批量冻存之前仍然需要进行适当的鉴定（参见13.1节）。

15.2.2 何时冻存

有限细胞系要培养至约第5代以获得足够的细胞进行冻存（参见15.4节）。连续细胞系则需要被克隆（参见16.1节、16.4节、16.5节），筛选出特定属性的克隆并获得足够数量进行冻存。

15.3 冻存细则

15.3.1 细胞冻存的理论背景

细胞最理想的冻存状态，是解冻时能有最大复苏存活率，这就需要尽量将细胞内冰晶的形成减至最少，并减少细胞内水结冰时高浓度电解质浓缩形成所带来的冷冻损伤。这将靠以下条件来实现：①慢速冷冻让水离开细胞，但不能太慢，否则将促进冰晶形成；②使用亲水性冷冻保护剂与水结合；③将细胞保存在尽可能最低的温度以减少冰内微团中高盐浓度对蛋

白质变性的影响；④快速解冻以减少细胞内剩余冰体融化时冰晶形成和电解质势差的形成。在一些特定情况下，如胚胎和胚胎干（ES）细胞的冻存，则不使用慢速冻存法，而是在液氮中急速冻存，通过形成玻璃化物质（玻璃化保存）而不是缓慢排出水分，以减少冰晶的形成（参见15.3.11节）。

15.3.2 细胞浓度

当以高浓度冻存时，细胞比较容易在冻存中存活。虽然这主要是经过大量的经验观察得出的，但这可能一定程度上与复苏时存活率下降而需要一个较高的种子浓度有关；并与由冰冻损伤引起的细胞通透性增强，从而需要高的细胞浓度以提高存活率相关。冻存时高浓度还使得复苏后重新接种时冷冻保护剂有足够的稀释度，从而省去离心（至少大多数细胞可以这样）。细胞冻存的数量应该多到足以使得解冻时有1∶10或1∶20的稀释比例从而稀释掉冷冻保护剂，但仍保持细胞的浓度高于平时传代的浓度。例如，一些细胞通常以1×10^5个/mL的浓度进行传代培养，那么将需要把1×10^7个细胞冻存在1mL的冻存液中，并且细胞解冻融化以后，1mL应被稀释至20mL，达到5×10^5个细胞/mL（正常接种浓度的5倍）。这将冷冻保护剂从10%稀释至0.5%，该浓度毒性减弱。对于接种浓度为2×10^4个/mL的细胞则可以1∶100进行稀释以达到1×10^5个/mL，且冷冻保护剂的浓度为0.1%。

15.3.3 冻存液

细胞悬液被冻存在含有冷冻保护剂如丙三醇或二甲基亚砜（DMSO）（Lovelock and Bishop，1959）的条件下。这两种保护剂中，DMSO显得更为有效，可能因为相比丙三醇而言，DMSO能更好地提高细胞的通透性。5%~15%的浓度均被使用过，但7.5%和10%更为常用。DMSO加入冻存液后，一般主张冰冻以前将细胞保存在4℃，但作者之前的实验表明这并不能提高冻存后的存活率；相反，甚至可能使其降低（未发表的观察结果），研究表明冻存前用DMSO进行预处理有助于提高杂交瘤的存活率，然而对施万细胞的存活率没有帮助（Wewetzer and Dilmaghani，2001）。这可能与细胞内通透性相关。然而，这一问题未被彻底解决，仍需要进一步实验（参见27.4节练习18）。有些情况中，复苏以后DMSO可能有毒性或者会引起细胞分化（参见19.7.2节），如造血细胞系L5178Y或HL60（M. Freshney，个人交流），在这些情况下，最好选用丙三醇或者解冻融化后将细胞离心以去除冷冻保护剂；或者，对于大多数单层细胞培养来说，残留的冷冻保护剂可以在第一次更换培养液的时候去除（一旦细胞贴壁）。

DMSO应该是无色的，需要保存在玻璃或聚丙烯容器中，因为它是一种极强的溶剂，可以溶滤掉橡胶和一些塑料当中的不纯物质。丙三醇保存不得超过一年，因为保存时间延长可能会变得有毒性。其他冷冻保护剂也被提到，如聚乙烯吡咯烷酮（PVP）（Suzuki et al.，1995）、聚乙二醇（PEG）（Monroy et al.，1997）和羟乙基淀粉（HES）（Pasch et al.，2000），但都没有像DMSO或丙三醇那样被广泛接受，虽然海藻糖可能还会有些改进（Eroglu et al.，2000；Buchanan et al.，2004）。很多实验室也会将冻存液中的血清浓度提高至40%、50%甚至100%。对于无血清培养体系，可

以加入 0.1%甲基纤维素或者 3% PVP 代替血清（Merten et al.，1995）（Sigma 公司）。

15.3.4 冷却速度

如果以 1℃/min 的速率降温，大多数培养细胞存活得最好（Leibo and Mazur，1971；Harris and Griffiths，1977）。这很可能因为在快速冷冻减小冰晶生长和慢速降温促使水向胞外迁移的过程中达到了一个折中状态。降温曲线的形状由以下几个因素控制：①环境温度；②细胞周围的所有隔热材料，包括冻存管；③冻存管内特殊的温度和容量；④冷冻时潜在的热吸收。当细胞在被置于一个超低温冷冻的隔热容器内冷冻时，如以下第 1 到 4 项方法，使得曲线在一开始就有一个快的降温速度。当温差达到最大，降到共晶点这一最低值时，冰冻开始出现，并伴有轻微升温，随后，由于冰冻潜热被吸收，温度将维持在一个稳定水平，接着冰冻完成后会出现一个更急速的降温，当达到冰柜温度时，降温则逐渐缓慢下来（图 15.1）。当细胞被转移到液氮箱时（或者在程序降温箱达到后期），温度将迅速降至–196~ –180℃。

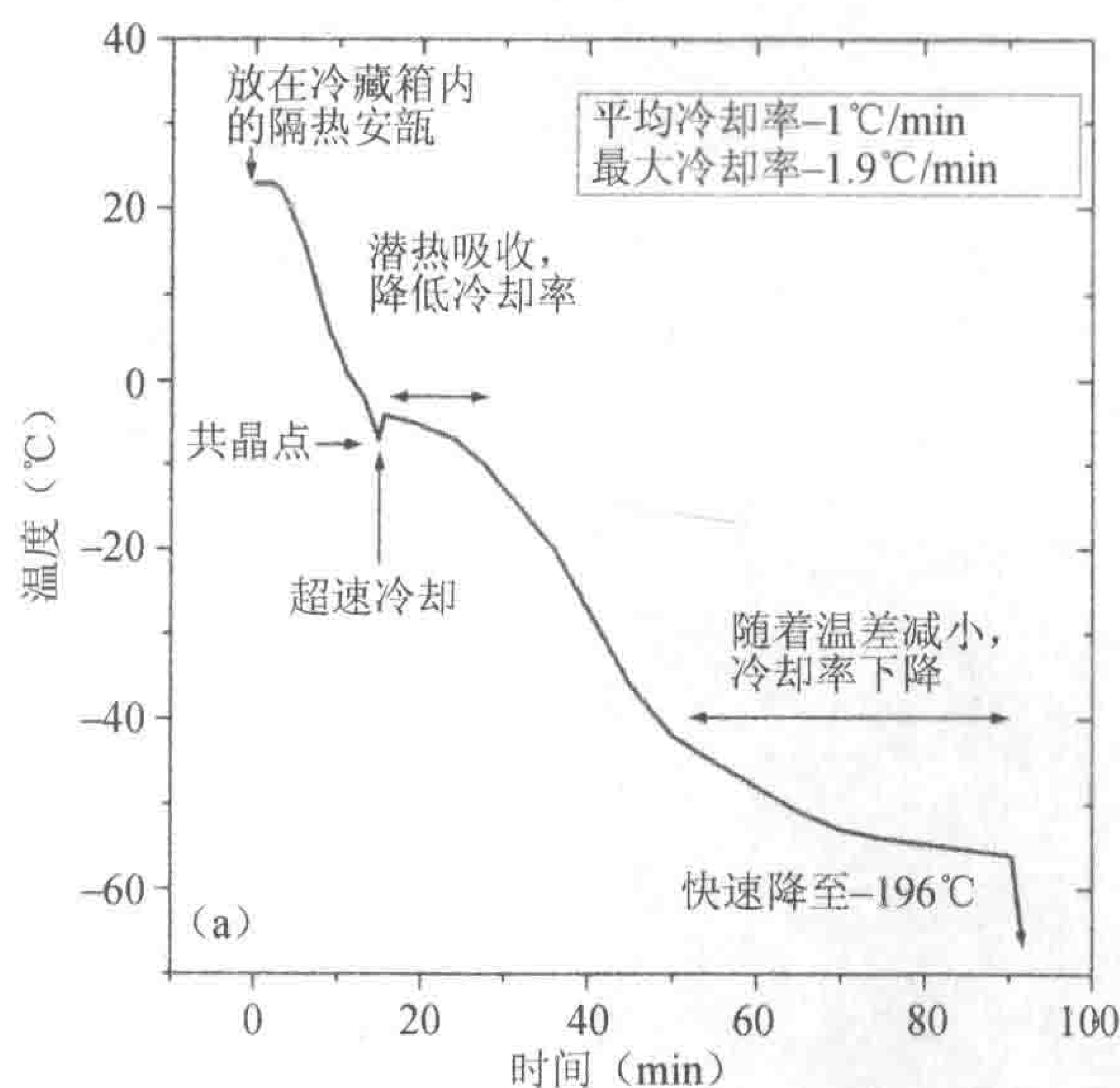
可控的降温速度可由以下任意一种方法实现：

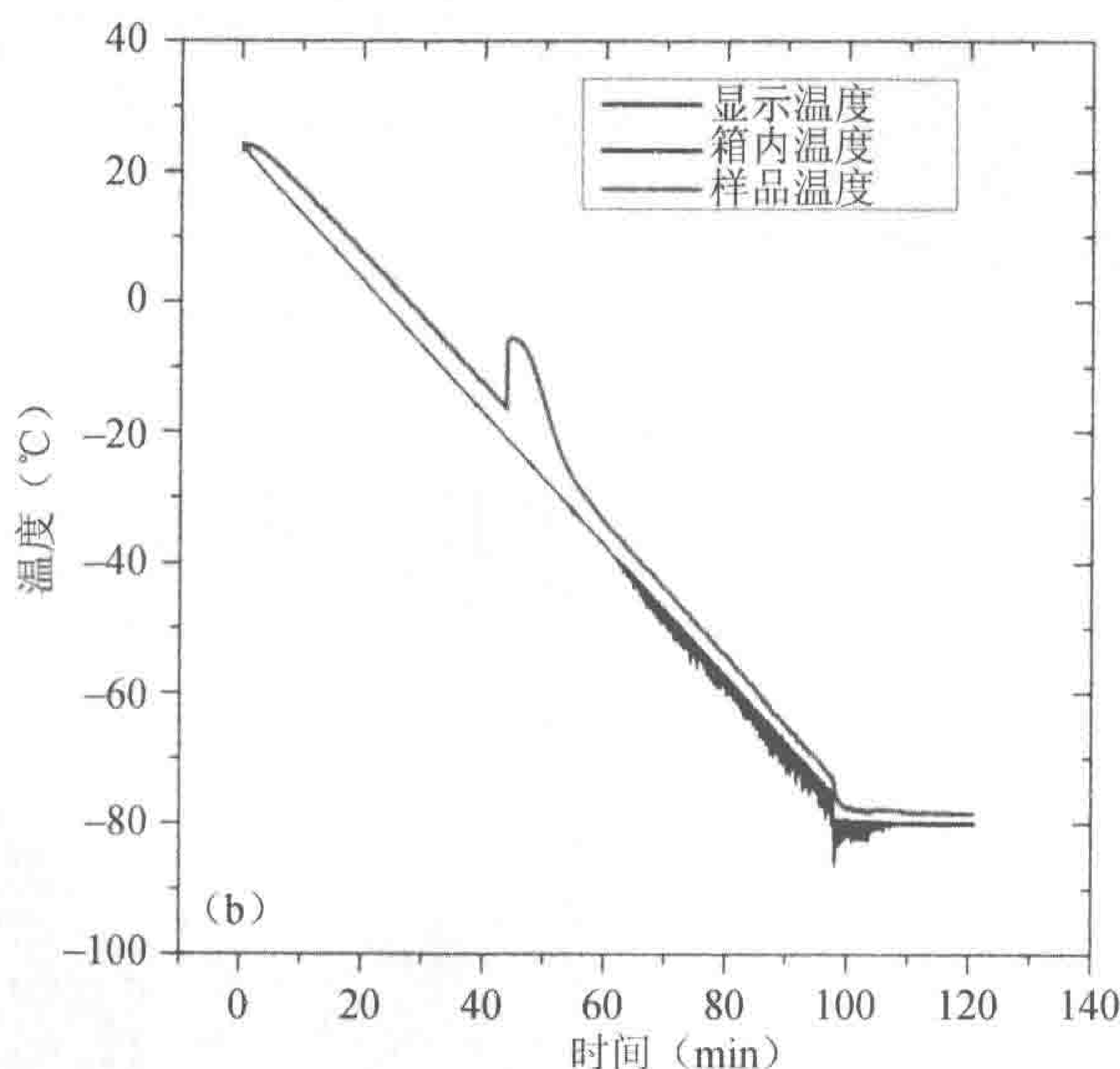
（1）将冻存管放于脱脂棉上并置于壁厚约 15mm 的泡沫塑料盒中，盒子加上脱脂棉能提供足够的供热层，使得当把盒子放在–70℃或–90℃的普通低温冰柜或含固体 CO_2 的隔热容器内时，冻存管可以以 1℃/min 的速率降温。

（2）将冻存条插入至管状泡沫隔热管，厚度约为 15mm（图 15.2），将隔热管放在–70℃或–90℃的普通低温冰箱或含固体 CO_2 的隔热容器中。

（3）将冻存管放入降温盒 Nunc Mr Frosty（Thermo Scientific 公司）或者 CoolCell（Bioscision 公司）的冷冻装置（图 15.3），并将其置于–70℃或–80℃。

（4）使用程序控温冰箱以实现 1℃/min 的速率冰冻（图 15.4），更快速经过共晶点加速结冰（参见图 15.1）。





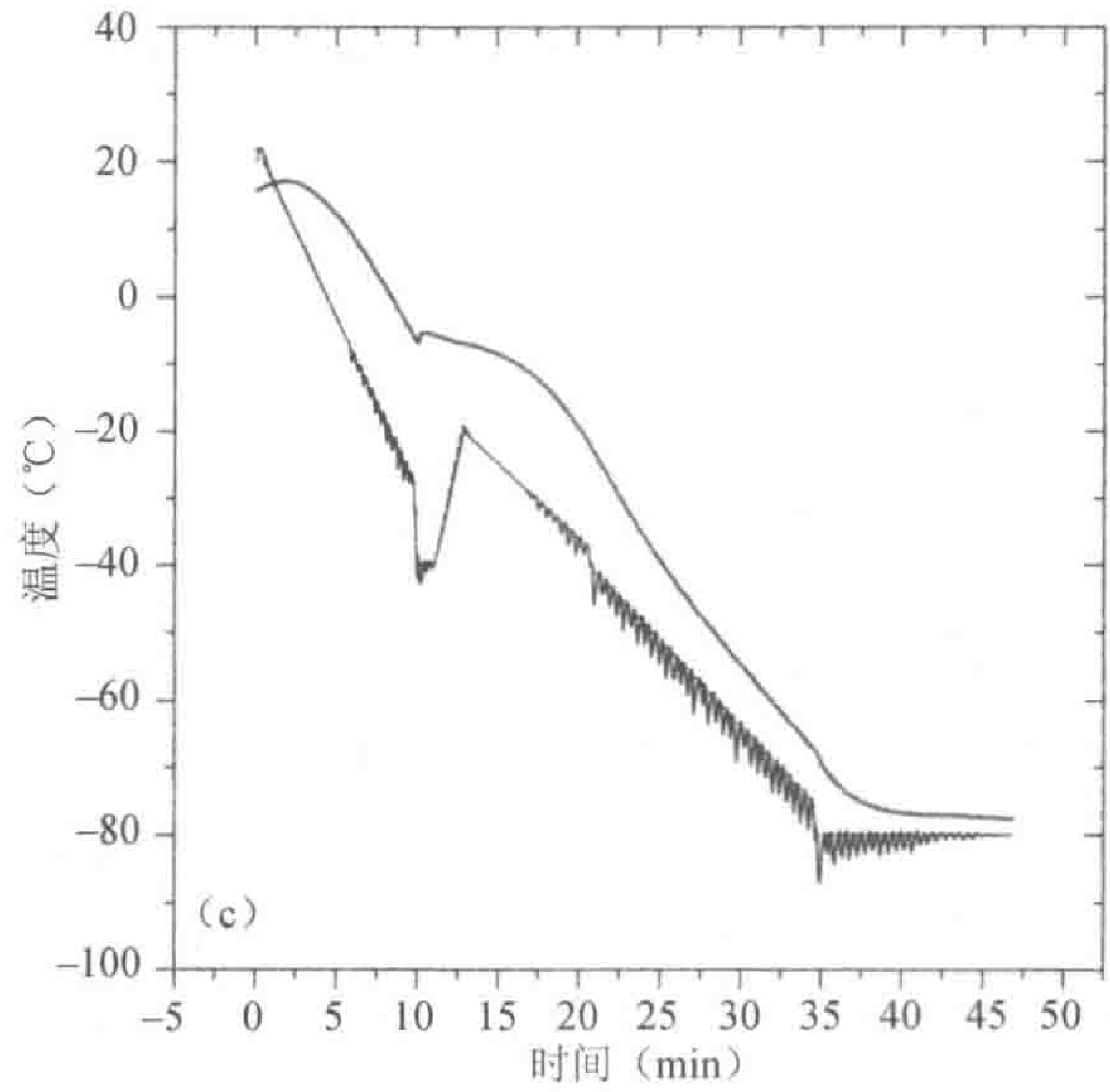


图 15.1 冻存曲线。在简易隔热容器或程序降温盒降温过程中，冻存管内部的降温记录。（a）将含有培养液的冻存管，与其他 5 个冻存管一起夹在同一铝棒上，装入硬纸管内，放入聚亚烯酰胺泡沫管中（参见图 15.2），并将其放在–70℃低温冰箱内；（b）放在降温率为–1℃/min 程控降温冰箱内的冻存管中；（c）优化的降温曲线在共晶点加速降温，能够实现最高的细胞存活率［（b）和（c）的数据由澳大利亚细胞库的 Elsa Moy 和 Amanda Capes-Davis 提供］

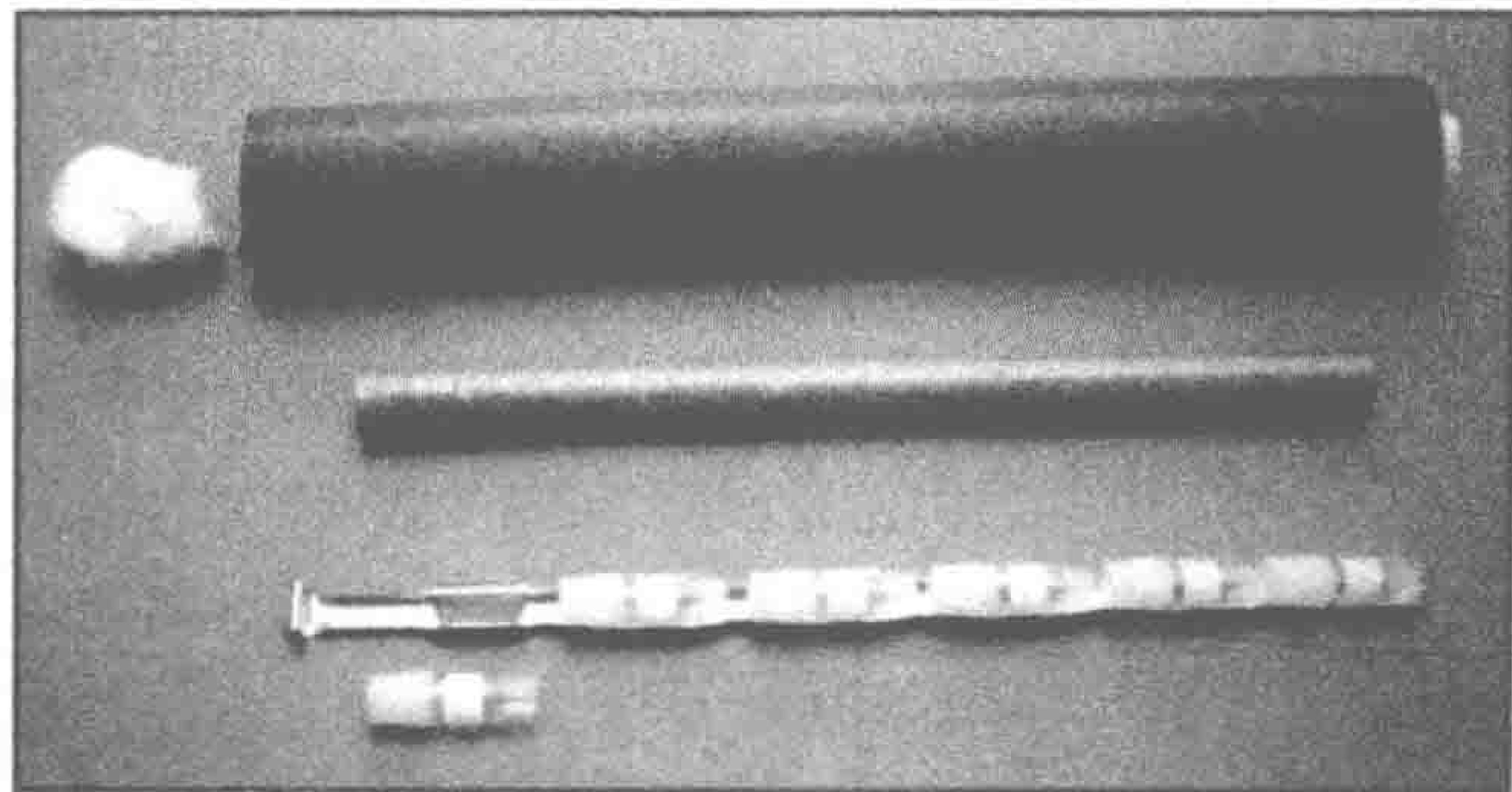
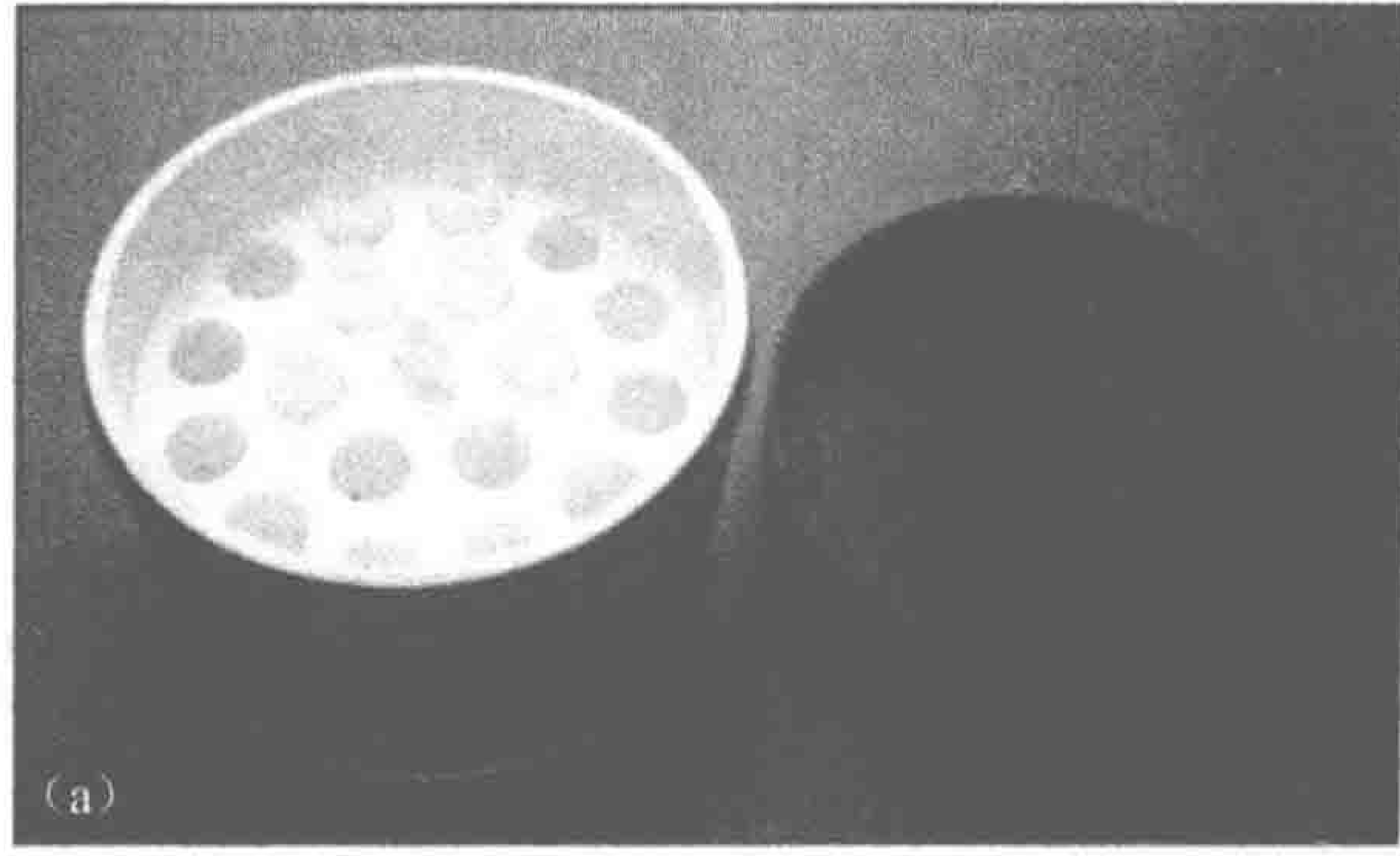


图 15.2 嵌于冻存条上的冻存管，具有隔热性，可缓慢降温。塑料冻存管被夹在铝棒（下）上，装入一硬纸管内（中），并放入一隔热泡沫管（上）内。放入–70℃或–80℃低温冰箱缓慢降温前，在隔热管任意一端塞上棉花或另一种合适的隔热材料



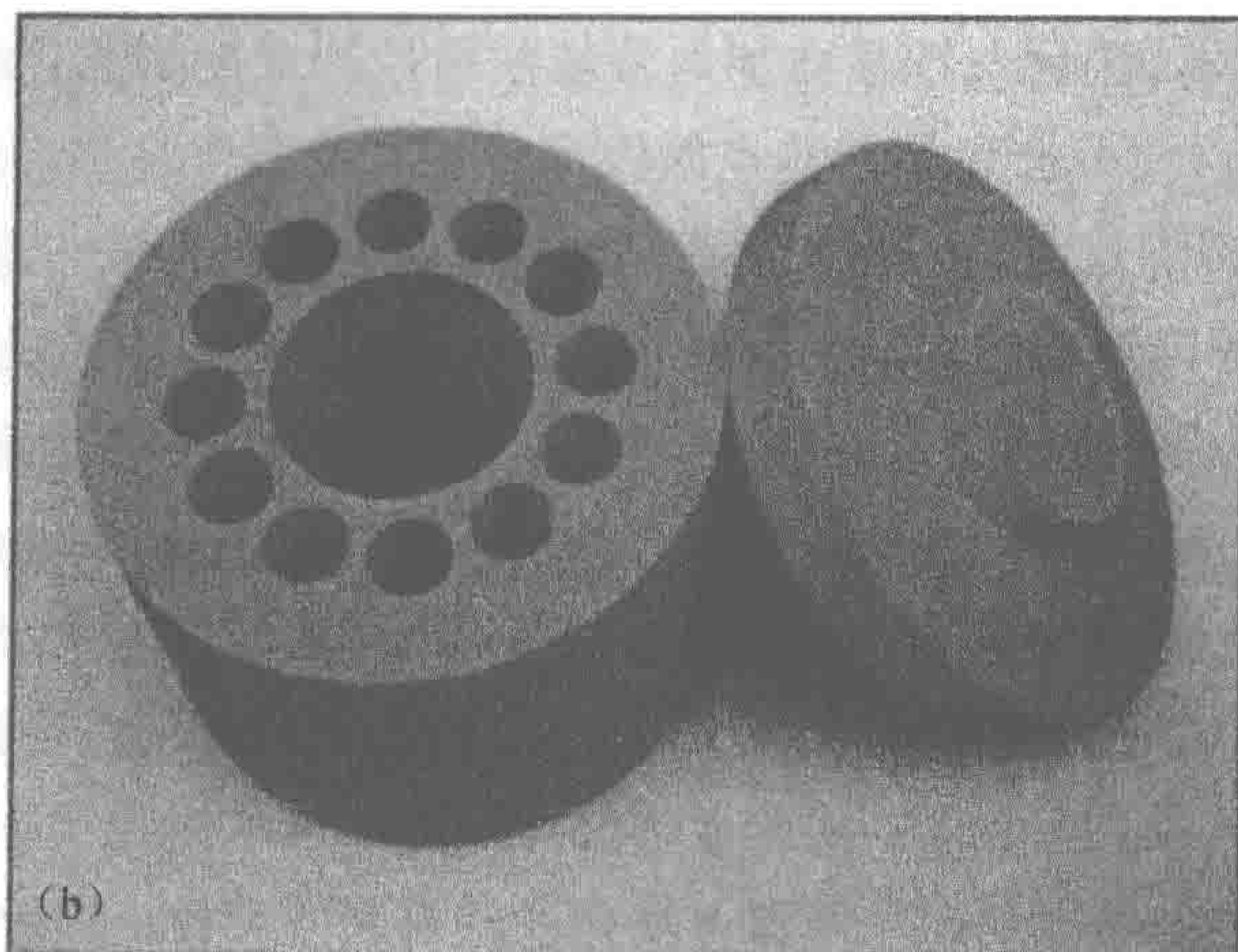
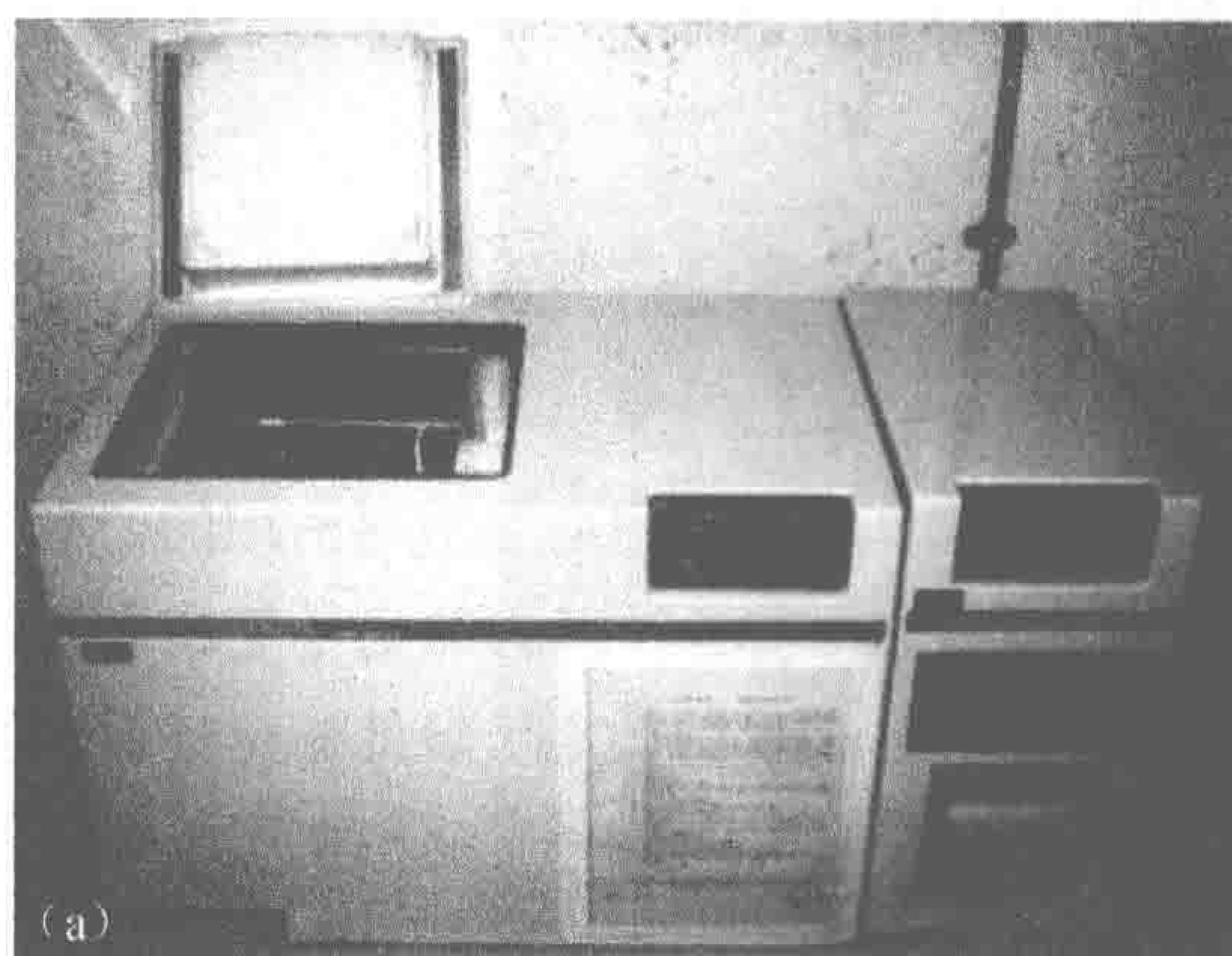


图 15.3 墩式降温盒。用于放置冻存管的隔热盒。(a) Nunc“Mr Frosty”(Thermo Scientific)。基底充满液体的塑料托架。底部冷冻液特殊的温度使容器隔热并为里面的冻存管提供约 1℃/min 的降温率;(b) CoolCell (Bioscision),通过泡沫隔热实现缓慢的降温率



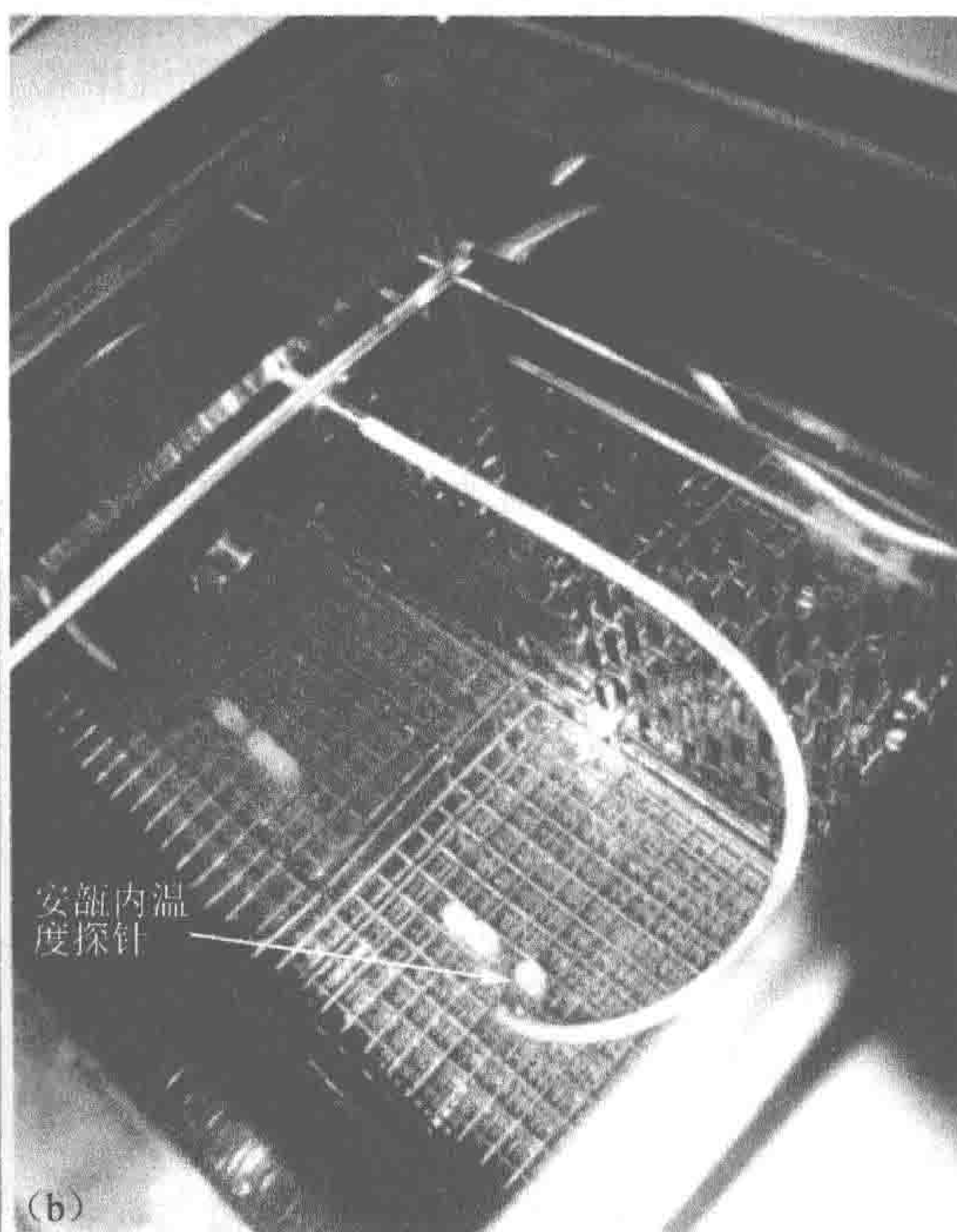


图 15.4 程控低温冰箱。冻存管被放在隔热柜内,降温率由向注入柜内液氮进行调节,注入液氮的速率由含有冻存管的支架上面的感应器和控制装置决定(Planer Biomed)。(a) 控制装置和冷冻柜(盖子打开);(b) 含有 4 支冻存管冷冻柜的局部显示,其中一支含有探针

在前 3 种方法中,如隔热管法(方法 2,见图 15.1a、图 15.2),降温率取的是整个曲线不同降温率的平均值,无法控制共晶点处的过冷或者再加热的现象,也无法控制潜热吸收时平台期的持续时间,而以上因素均可能会影响细胞的存活。如果复苏效率低,将考虑改变平均降温率(如使用更多或更少的隔热层)。程序控制冰箱含有探针(参见图 15.1b、c,图 15.5),该探针可以监

测冻存管温度并以正确的降温率向冰箱内加入液氮从而达到程控降温速率，这样可以使过冷现象带来的压力降到最小，并可在包括共晶点时温度急转的降温全过程实现线性降温。然而降温过程中简单的–1℃/min 降温速率并不能实现冻存管内的线性降温曲线（图 15.1b），且存活率低于简易的隔热装置。复杂的降温曲线，即在不同的降温点呈阶梯状，能确保共晶点过程中的波动降至最低（图 15.1c）。即便降温曲线不是线性的，但降温曲线与隔热盒或者隔热管的降温曲线类似，就能够达到最佳存活率（图 15.1a）（数据来自 Elsa Moy and Amanda Capes-Davis）。图 15.1c 的实际降温速度比图 15.1a 的快（大约是–2.75℃/min：–1℃/min），但是与共晶点邻近温度的控制相比，这种差异没那么重要。当细胞悬液降温至共晶点，就能开始结冰并提高存活率。

降温曲线不同时期的不同降温率，实验上使细胞适应冰冻的最佳状态，可以被设计到降温曲线中。然而，和之前描述的第 1 到 3 项降温方法中的简易装置相比，程控降温仪相对较昂贵，而且也没有什么优点，除非你在冻存特殊细胞中遇到问题，需要使用不同的降温率（如 Foreman and Pegg，1979）或改变降温曲线的形状。然而与简单的装置相比，它们确实在一定程度上使降温条件更加标准，也更加符合 GMP 平台的需求。

在隔热容器法中，降温率与冻存管和周围空气间的温差成正比。如果冻存管被放在冰柜–70℃内，它们将会迅速降至–50℃，但之后降温率将会显著下降（图 15.1a）。所以，冻存管在–70℃冰箱内放置的时间要比根据 1℃/min 降温率所设计的时间长，因为曲线的底部是渐近线。把细胞转移到液氮之前，将冻存管留在–70℃过夜更为保险。另外，当从冰柜中移除时，细胞可能会以约 10℃/min 的速度升温。它们不能升温到–50℃以上，这很重要，因为它们会开始变坏，所以转移到液氮箱内绝不能超过 2min。

或者，细胞可以采用速冻，使得液态培养基发生玻璃化（参见 15.3.11 节）。

15.3.5 冻存管


彩版 22

塑料冻存管比玻璃冻存管更为安全和方便，但是一些储存室和细胞库更喜欢使用玻璃冻存管用于种子保存，因为玻璃具有长期保存的优良特点，如果操作正确，将会是绝对密闭的。塑料冻存管通常是聚丙烯，1.2mL 是最常用的大小（彩版 22e）。它们可能会被细尖的记号笔或者预先印好的标签做上标记，二者都应该是防乙醇的，并且能够耐受冰箱里的低温（参见补充材料中的附录Ⅲ：冻存记号笔；冻存标签）。标记应该显示细胞株名称，最好还要有日期和使用者姓名的首字母，虽然后者常常在有限的空白处没有位置可写。如果细胞系目录保存在计算机上，标签可以被自动打印，如果有必要的话还可以打印条形码。不同颜色的盖子也可以帮助标记（彩版 22e）。记住，冻存在液氮中的细胞极可能比你存活得时间还长！在特定实验室内，它们可以轻易地就比你活得长。因此，记录应该简单明了地展示给其他人，并且应该含有足够全面的信息量以方便这些细胞也能被其他人使用（参见 15.3.8 节）或者丢弃（如果没人使用）。

塑料冻存管需要正确拧紧，因为如果太松或太紧（由于 O 形橡胶圈变形）都会发生泄漏。因此很有必要对新批次的冻存管进行练习以确保它们密封正确。我们可以将冻存管放在染色皿内检查泄漏，如含 1%亚甲蓝的 70%乙醇，冰冻前 4℃放置 10min。如果冻存管没有合适地密封，染料则会被吸入冻存管内，则该冻存管应被丢弃。另外，有时候，不好的冻存管可能会在解冻过

程中发生碎裂，因此需要核实冻存管是否耐受液氮的低温。塑料冻存管比相同的玻璃冻存管更高、直径更大，所以必须使用特殊的冻存条。大部分抽屉式储存系统能够容纳 1.2mL 的冻存管。

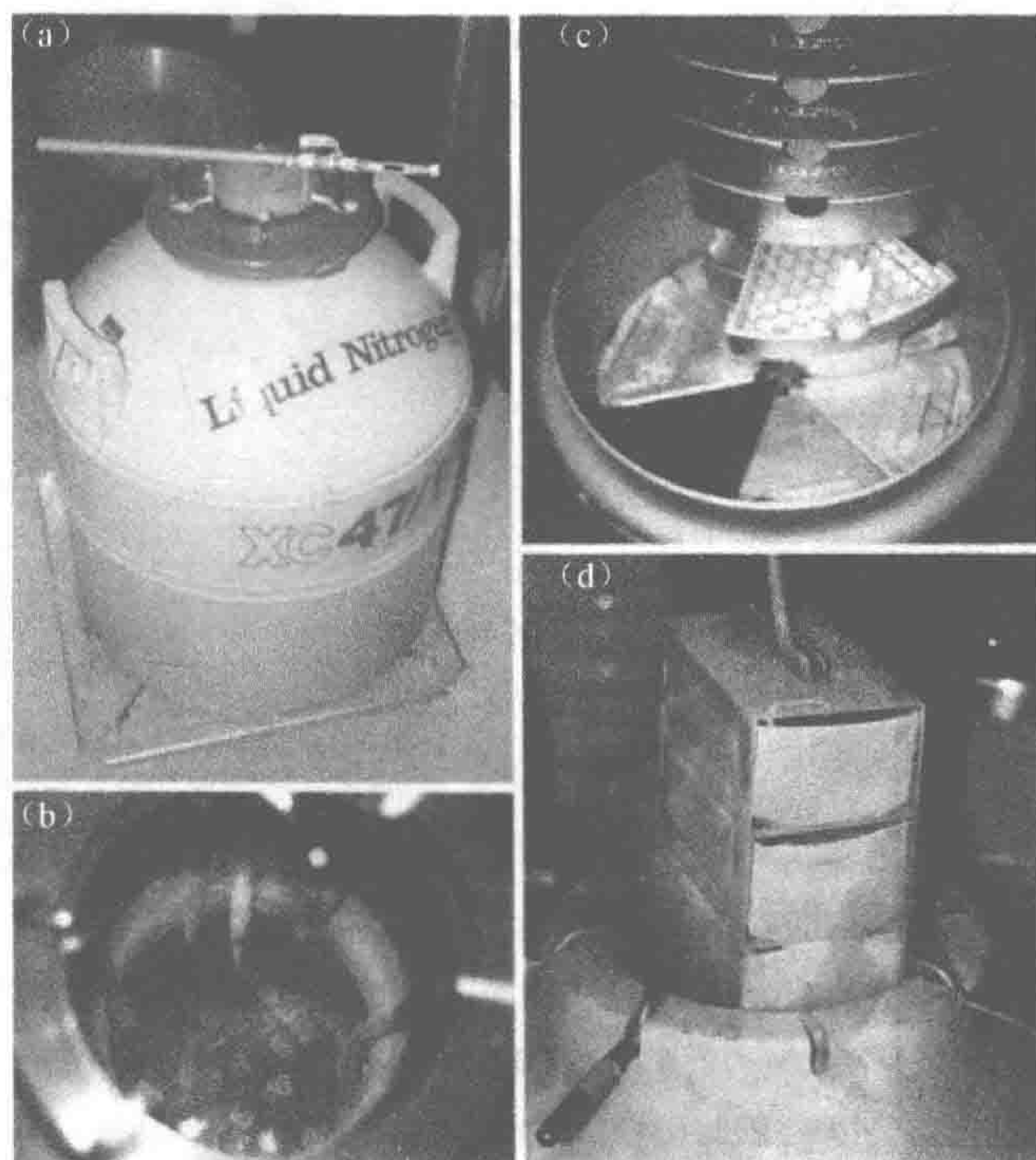
可以将塑料冻存管放入 Nunc Cryoflex（一种冻存管套，Scientiis or Thermo Scientific 公司），从而使爆炸和污染的风险降至最低，但是由于冻存管套会使解冻时间延长，并可能使水浴锅的水渗入管套和冻存管之间，因此需要在解冻前将管套摘掉。由于需要通过加热对冻存管套进行密封，因此这时候需要将冻存管放在冰上，防止细胞温度过热。还有一点很重要：确保冻存管大小适宜、能够放入冻存条和套筒或者抽屉式系统内，并且你的标签能够被肉眼或读码机识别。除非冻存管内的东西有生物毒性，储存在液氮气相或者灌注式夹克冰箱内的冻存管可以不使用冻存管套。

▲安全提示 经验不足的使用者应该避免使用玻璃冻存管，因为解冻的时候非常有可能会发生爆炸。如果使用玻璃冻存管，它们需要完好且快速地在氧气焰上密封。如果密封花的时间过长，细胞会被热死，冻存管内的空气会膨胀并在其顶部吹起一个孔。如果冻存管没有被完好地密封，则有可能会在其储存在液氮箱液相内的时候，液氮渗入其中，随后在解冻时发生剧烈爆炸。如果使用玻璃冻存管，应该将其放在液氮气相或者放在灌注式夹克冰箱内（参见 15.3.6 节）。

15.3.6 低温冰箱

当温度达到或低于–70℃时，冻存的细胞会被快速转移到低温冰箱内。储存在液氮罐中，是当前长期保存细胞系最合适的办法（图 15.5、图 15.6，又见 4.5.3 节）（Hay，2000）。

低温冰箱的设计在入口颈部大小、使用的储存系统和液氮的存放这些方面有所不同（图 15.6）。



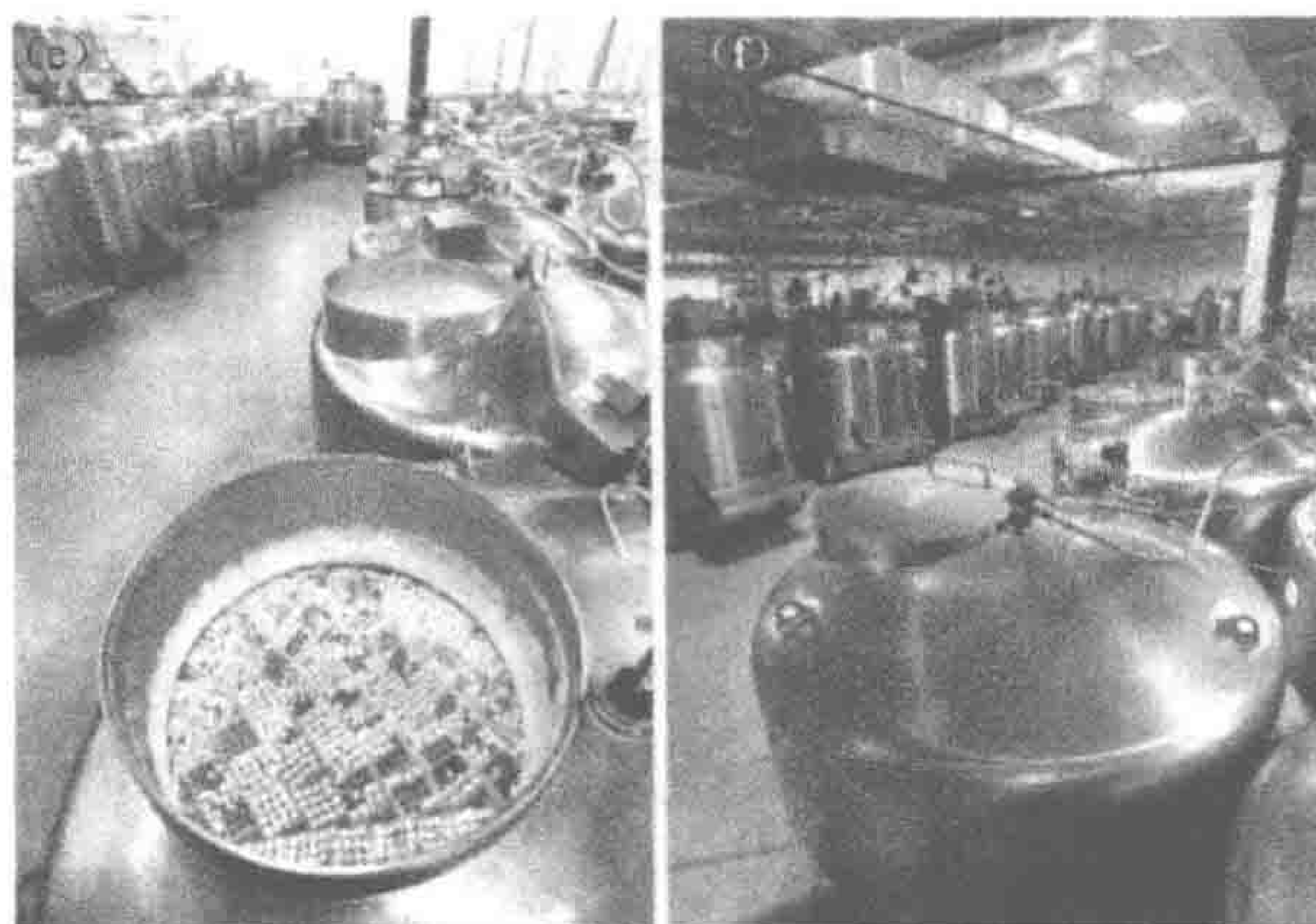


图 15.5 液氮冷藏箱。(a) 罐内储存有冻存条的细口冷藏器；(b) 细口冷藏器的内部，向下看罐内的冻存条，放在中间以便取出，正常储存位置是在冷藏器肩部以下，从顶部刚刚可见；(c) 带含存货的三角形抽屉的广口冷藏器；(d) 带含存货的正方形抽屉的细口冷藏器（见图 15.6）；(e) 侧面入口打开的高容量冷藏器，展示罐内的冻存条；(f) 细胞库内的高容量冷藏器。最近的冷藏器显示与监控和自动灌注连接（e，f，照片由 ATCC 友情提供）

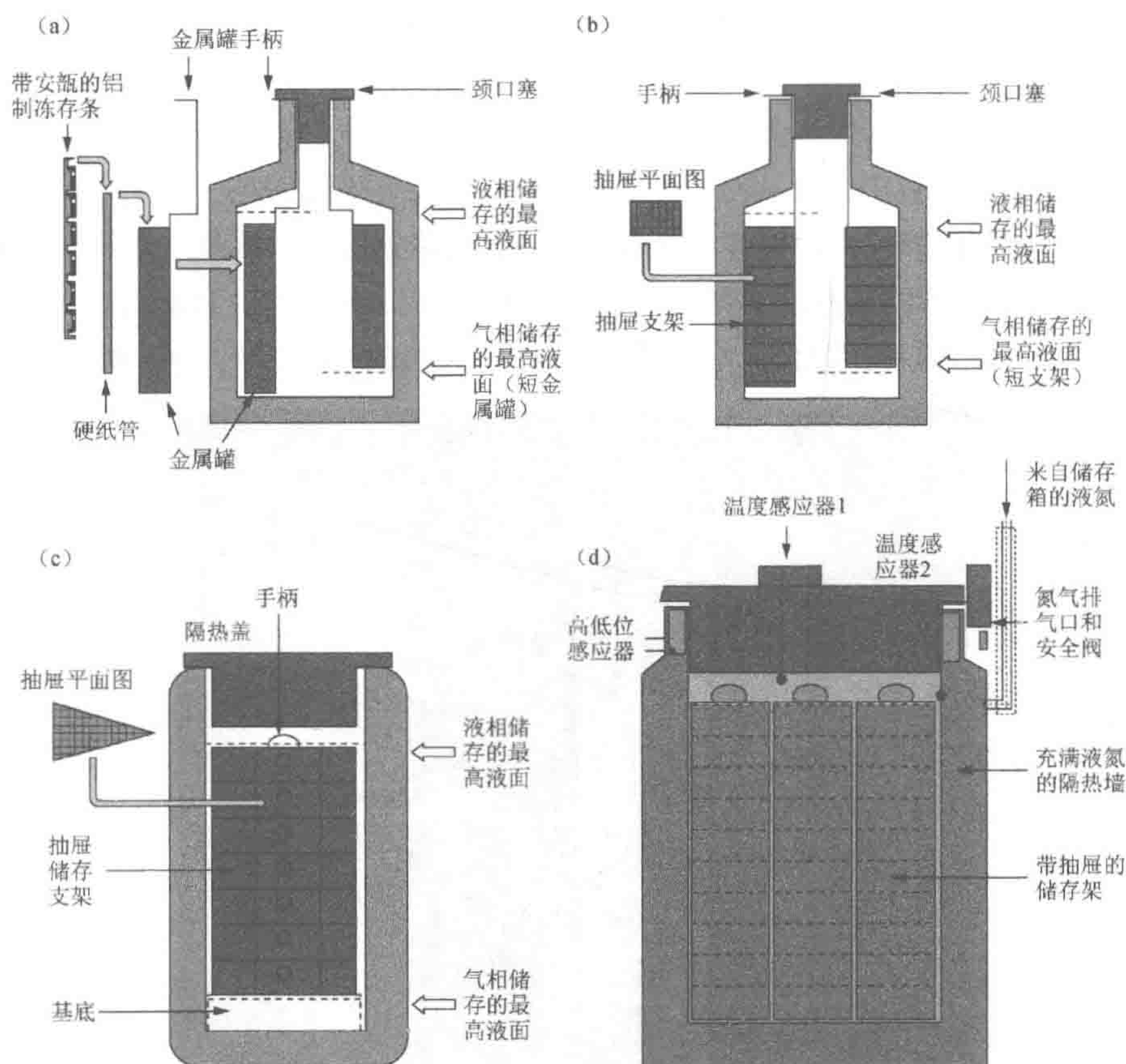


图 15.6 液氮冷藏箱设计。4 种主要的液氮冷藏箱类型：(a) 冻存管在冻存条上的细口液氮罐（高容量、低蒸发率）；(b) 冻存管在正方形支架内的细口液氮罐（普通容量、低蒸发率）；(c) 冻存管在三脚架内的广口液氮罐（高容量、高蒸发率）；(d) 保存在抽屉内的广口液氮罐；向液氮罐壁内（恒温槽）进行管道灌注液氮，液氮水平由高低位感应器（左上）自动控制（大容量，整体恒温）

入口大小 筒状储存系统往往是细颈的（图 15.6a、b，图 15.7a），这减少了液氮的蒸发率，但使得放入时不太方便。广口冷藏器放入方便且容量大，内部隔断带有抽屉，但是常常蒸发得更快。然而，如果仍使用托盘体系储藏时，最好还是用相对细口的冷藏器。冷藏器依据矩阵储藏盘进行库存管理；这些盘被装架在支架上，就像常规细口冷藏器中的冻存条和金属筒的存放一样（图 15.6d、图 15.7b），有一样的支持能力，并有许多人更喜欢的蜂窝状储存布局（参见下文）。

储存体系 细胞培养工作中，有两种主要类型的储存方式适用于 1.2mL 的冻存管。冻存条体系使用夹在铝棒上的冻存管，冻存条插入管套筒内，并放入冷藏器内的圆柱筒中。该体系的优点在于冻存条可以一次同时放置 6 份冻存管，一个冻存条上所有的冻存管为同一细胞系，这使得从降温装置转移到冷藏箱内更为简单和快捷。管套筒原来是硬纸板材质，但是现在有了透明的塑料套筒，如 Nunc Cryosleeve 塑料冻存管套（Capitol Scientific；Thermo Scientific 公司）。冻存条可被涂色和编号，这使得查找相当方便，一整条冻存管可以被部分抽出来取出一个冻存管，而不用将其他所有冻存管暴露在暖和的环境中，也避免了将冻存管放回时放错位置的失误。一些使用者更喜欢储存在长方形抽屉里，因为他们觉得提取更简便，每个冻存管可以通过抽屉编号和抽屉内的坐标被识别出来。然而这确实意味着抽屉里所有的东西（可能有 20~100 个冻存管）在取出其中一个的时候所有的冻存管会被一起暴露出来，如果要使用低层的抽屉，那么整个架子都要被提出来，并且将冻存管放回到错误的位置的风险也更大；而且将大量冻存管装进抽屉的时候一次只装一个，有耽误时间和过热的风险，除非程序冷藏箱内一整抽屉内一大批冻存管需要同时冻存。

液氮的存放 如果液氮被放在冷藏器的主体内，有一种方法就是将冷藏器灌满然后把冻存管浸在里面，或者只灌入部分液氮，将冻存管存放在气相中。存放在液相中表明容器可以被填充，液氮因此会保持得更长，但是有漏的冻存管吸入液氮的风险，这样在解冻的时候会发生剧烈的爆炸。外源环境带来的污染传递到冻存管的可能性也更大，外源污染可能由外物带入，并因罐内液氮的不断挥发而浓缩。尽管缺少充足的证据（Bielanski et al.，2000；Grout and Morris，2009；Pomeroy et al.，2009a；Parker，2011；Bielanski，2012；Tomlinson and Sakkas，2000），但是报道发现彻底清理液氮罐的时候，常常能发现很多残余物，这就是液相和气相储存容器存在污染的证据（Fountain et al.，1997）。随着改良隔热材料的引进和蒸发减少，气相储藏变得更受欢迎。这减少了向液氮插入东西时液氮翻滚乱溅的危险，也减少了液氮向室内空气蒸发。然而，在液氮表面上到液氮口有一个约 80℃的温度梯度，在气相内为–190~ –110℃（Rowley and Ryrne，1992），尽管支架体系的设计和结构可能有助于减少这个梯度。

一些冷藏箱是将液氮存放在箱壁内而不是储藏箱体内。这些低温冰箱指的是各种不同厂家生产的恒温箱或者恒温冰箱（例如，Panasonic；Custom Biogenic Systems）。它由高低位控制自动装置完成液氮的补给（图 15.6d），蒸发的液氮通过排气阀释放。该装备具有气相储藏的优点，且只需消耗更少量的液氮并减少了温度梯度。但是，液氮水平线是看不见的，而且无法通过量油尺测量，因此完全需要依赖电子监控（参见下文）。另外，冷藏箱壁内任何液氮流动堵塞是很困难甚至是无法消除的，因此液氮过滤是必不可少的，该操作必须执行以确保没有水或水蒸气进入该系统，因为冰也会堵塞液氮流动。这些冷藏箱的液氮消耗量也非常高。

▲安全提示 生物危害性物质绝对不能保存在液相内，教学和实验示范也不应该用液相储存进行。最重要的是，一旦使用液相储藏，使用者必须意识到玻璃和塑料爆炸的危害，必须佩戴面罩。

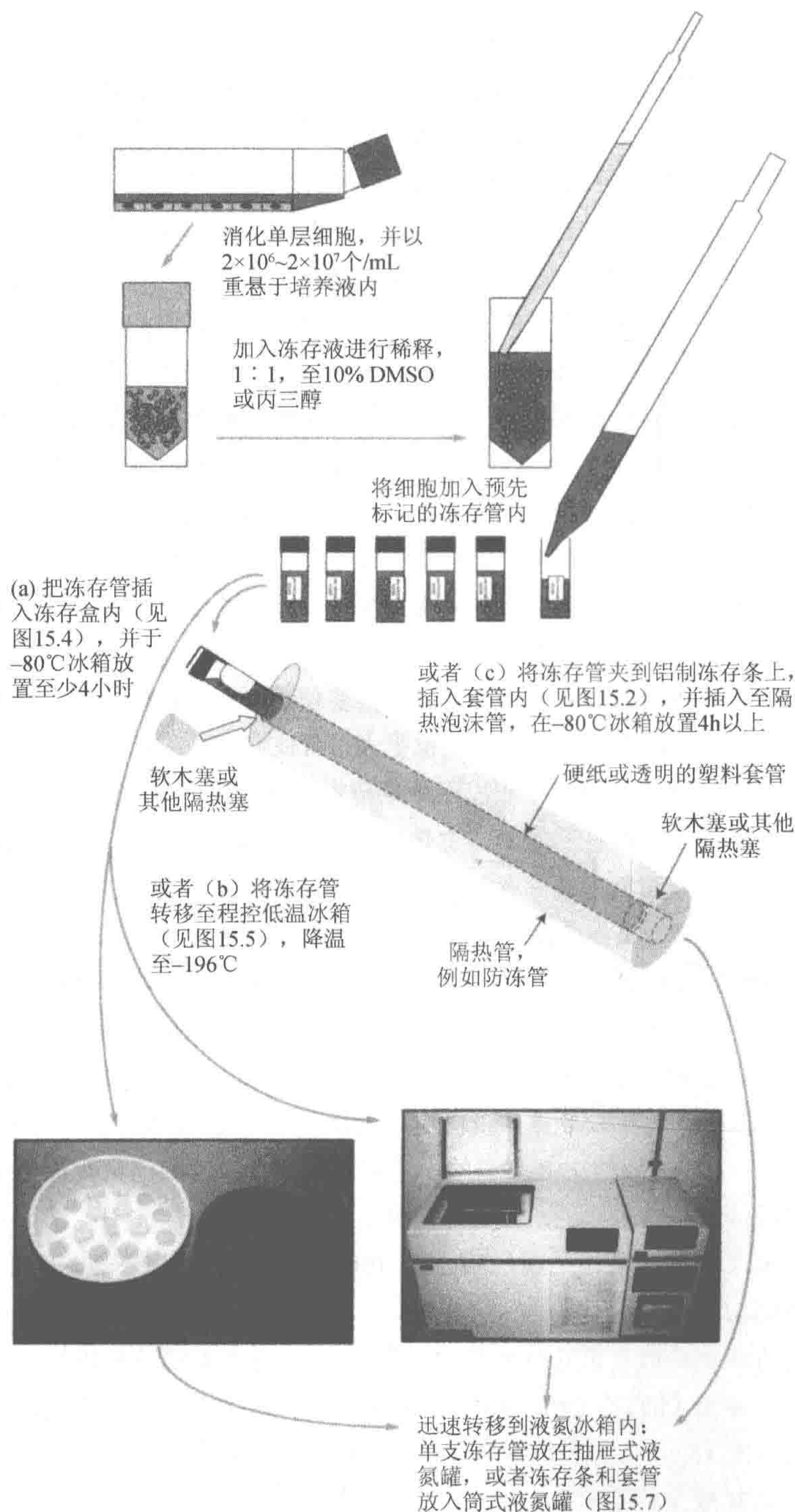


图 15.7 细胞冻存。消化后的细胞，在含冷冻保护剂的冻存液内，分装至冻存管内，然后可能（a）在降温盒内缓慢降温，降温盒放在–70℃或–80℃ 4h 或者过夜，随后转移到抽屉式液氮罐内（参见图 15.7b、c、d），或者（b）在程控低温冰箱内降温至–196℃，随后转移到抽屉式液氮罐内，又或者（c）将冻存管夹到铝制冻存条上，插入硬纸或者塑料管内，并插入到隔热管中。把隔热管和其内容物放在–70℃或–80℃ 4h 或者过夜后，将含有冻存管和冻存条的套筒放入筒式液氮罐内（参见图 15.6a）

液氮的监测和补给 液氮箱内的资产很重要，必须通过严格的监测制度和电子液位警报器保护好。如果液氮在储藏箱体内，那么至少应该一周一次使用量油尺对其水平进行检测，并记录在图表内。即使使用自动灌注设备，这些也要做到，因为自动设备有可能出故障。如果液氮是被完全封闭的，再灌注则是根据储藏箱壁内水位控制自动完成的，但仍必须另外单独配备两个温度记录仪，两个都应该能够报警，分别在温度高于–170℃和–150℃时发出警报。由于不会有人天天出现在液氮罐附近进行监测，那么比较明智的做法是，将至少其中一个记录仪配备远程探测仪和警示灯，并安装在楼道人多的区域。

如果没有液氮储存，细胞可以储藏在普通冷冻箱内。冷冻箱内温度应该越低越好，最好在–150~–140℃；–196℃几乎发现不了变质现象（Green et al.，1967），但–70℃的时候可能会发生明显变质（每年 5%~10%）。水的玻璃化温度是–132℃，长期保存最好低于该温度。

15.3.7 培养细胞的冻存

方案 15.1 是根据大多数培养细胞系的最适条件制订的，但对于一些细胞，冻存速率或保存方法可能会有所改动（参见 15.3.4 节）。大多数冻存液需要加入 DMSO，但有些细胞的冻存使用丙三醇会更好。DMSO 可能对有些细胞有毒性，但有些常常是因为 DMSO 会导致细胞分化（如 HL-60 细胞），并且这些细胞解冻后再也不能增殖。因此，以下将介绍两种冷冻保护剂的使用过程。

冻存管可以不超过 6 个一组放入冻存条内或者单个地放入不同区域的抽屉内（参见 15.3.6 节）。尽管使用冻存条步骤更为烦琐，但是可以一次处理一组 6 个冻存管，这与处理单个冻存管相比，操作更为简单，转移到液氮罐内也更加快捷。

方案 15.1 细胞冻存

概要

将细胞培养至对数期晚期，在含有冷冻保护剂的冻存液内制备高浓度的细胞悬液，分装至冻存管内，然后慢速冷冻（图 15.7）。

材料

无菌或无菌制备

- 要冻存的细胞
- 如果是单层细胞：D-PBSA 和 0.25%粗制胰蛋白酶
- 生长培养基（血清提高细胞冻存后的存活率；≤50%，或甚至可使用纯血清。如果血清被无血清培养使用，解冻后应该被洗掉）
- 冷冻保护剂，不含杂质（参见上文）：玻璃或聚丙烯小瓶（带不具垫片的聚丙烯盖子）装的 DMSO，或独立包装的新鲜丙三醇。一般认为 DMSO 自身是无菌的，但也可以通过尼龙滤器对

其进行过滤消毒（大多数滤器会被 DMSO 溶解），不过最好是用培养液稀释后再进行过滤。丙三醇可以通过高压蒸汽灭菌法进行消毒

- 注射器，1~5mL，用于配制丙三醇，如果被用到的话（因为丙三醇有毒）
- 塑料冻存管，1.2mL，预先标记好细胞系名称和冻存日期

非无菌

- 血细胞计数器或电子细胞计数器
- 储存用冻存条或冻存架（冻存架可能已经放置在冷藏箱内）
- 冻存用隔热容器：里面填衬了脱脂棉的聚苯乙烯盒或塑料泡沫隔热管（隔热管，如 Pipe Lagging）（参见图 15.2）或程序降温仪（如果有的话）（图 15.4）
- 防护手套，腈类的
- 接触液氮时，合适的安全防护装备
- 实验服
- 隔热手套（例如，VWR 公司的低温防护手套）
- 面罩

操作步骤

1. 确保冻存的细胞满足冻存要求（表 15.1），用肉眼或显微镜检查以下内容。

   （a）健康的外观（参见 12.4.1 节）。

   （b）形态特征（参见 18.4.1 节）。

   （c）生长周期内所处时期（应该是进入平台期之前的对数期晚期）（参见 12.5.3 节）。

   （d）无污染（参见 14.3 节）。

2. 将细胞培养至对数期晚期，如果是单层细胞，将其消化并计数（参见方案 12.3、方案 23.1）。如果是悬浮细胞，计数并将细胞离心（参见方案 12.5）。

3. 以 2×10^6~2×10^7 个/mL 的浓度重悬细胞。

4. 将其中一种冷冻保护剂稀释到生长培养基内制备含双倍浓度冷冻保护剂的冻存液。

   （a）添加 10%~20%的二甲基亚砜（DMSO）。

▲安全提示 DMSO 可以渗透很多合成的和天然的膜，包括皮肤和橡胶手套（Horita and Weber，1964）。任何潜在的常用物品内的有害物质（如致癌剂）可能会通过皮肤甚至橡胶手套被成功带入循环系统。使用 DMSO 的时候应该谨慎，尤其是有有毒物质存在的时候。对于短时间接触 DMSO，腈类手套有一定的保护作用，但是与 DMSO 接触数分钟便会发生降解，因此，接触 DMSO 后，应该更换手套。如果需要进行长时间分装，则建议使用丁基橡胶手套（Cornell Univ.，1999）

   （b）添加 20%~30%的丙三醇。

5. 以 1∶1 的比例用冻存液稀释细胞悬液，以达到 1×10^6~1×10^7 个/mL 的浓度，以及含有 5%~10%的 DMSO（或 10%~15%的丙三醇）。没有必要将冻存管放在冰上防止细胞变质。当使用 DMSO 和丙三醇的时候，在室温耽搁 30min 之久都是无害的。

6. 将细胞悬液分装到标记好的冻存管内，不损坏密封垫，拧紧冻存管的盖子使其密封。

7. 如果是罐式储存，将冻存管放在冻存条上（图 15.2，图 15.6a、b，图 15.7a），如果是抽屉式储存，

让它们散装（图 15.6c、d，图 15.7b~d）。

8. 采用上述方法中的一种（参见 15.3.4 节）使冻存管以 1℃/min 的速度冷冻。隔热容器法中，如果开始室温为 20℃，将它们放到–80℃后至少还需要 4~6h（参见图 15.1），但最好将容器内的冻存管留于–80℃过夜。

9. 当冻存管达到–80℃或更低温度时，将冻存管从–80℃冰箱或程序控制降温仪内移除前检查冷冻记录，并确认冻存管在恰当的位置。

10. 将冻存管转移到液氮箱内，最好不要进入液体内，将冻存条和冻存管放到预定的罐内或将单个冻存管放到预定抽屉的正确位置上。转移必须快速完成（＜2min），因为冻存管会以约 10℃/min 的速度升温，如果温度升到–50℃以上，细胞会迅速变质。

▲安全提示 当将冻存管放入或靠近液氮时，一定要使用防护手套和面具。

11. 当冻存管被安全放到冷藏箱内，在冷藏箱目录内完成相应的记录（参见 15.3.8 节，表 15.2、表 15.3）。

15.3.8 冻存记录

记录应该提供以下信息。

（1）显示冷藏箱内每部分都有什么详细目录。

（2）空余储藏空间的显示。

（3）描述细胞系的细胞株索引。

- （a）名称
- （b）来源
- （c）培养详情
- （d）冻存过程
- （e）特殊属性
- （f）采取了哪些质控措施、日期及使用方法
  - （i）鉴定
  - （ii）无污染的证明，尤其是支原体污染

（4）冻存位置。

该记录应记在普通档案盒内，但计算机数据库可以提供更卓越的数据存储和提取，也能打印标记。该数据应该在同一资料库内不同表格中分别给出，以显示该细胞系的由来（表 15.2、表 15.3，见 11.3.11 节、12.5.8 节）。确保计算机记录在其他地方有备份，同时应将计算机打印稿打印出来。

计算机数据库的使用需要冷柜管理员来管理该数据。如果记录是使用者做的，那么使用者可以有读取和填写权限，否则保种和配送记录（参见 15.4.1 节）只有管理者有权限；或者，整个文档只能被管理员根据卡片或记录表上的纸质记录进行读取和更新。现在市场上有大量商用的库存控制系统（Cryotrack，Planer；Pro-Curo；Selznick；Harris；Itemtracker）。

表 15.2 细胞系记录

细胞系	冻存日期：		新卡片
	位置：		

种类：正常/成人/胎儿/NB 肿瘤	**支原体**：方法 检测日期 结果	**冻存说明**： 冻存速率 保护剂 %
组织： 位置 传代数/ 遗传代数	**认证**：	**解冻说明**： 迅速解冻至 37℃
起源：参考文献 生长模式	检测日期 方法	稀释至： 5mL 10mL 20mL 50mL
	常规培养：	离心去掉保护剂？ 是/否
特殊属性：	传代接种 浓度 试剂 操作频率 培养基 类型 血清等…% 更换频率 气相 缓冲液 pH	**特殊要求**
填卡人签名： 日期	**其他特殊条件**：	**生物危害预防措施**：

表 15.3 冻存记录

位置：冷藏箱编号 ________________ 罐/区编号 ______________________ 管/抽屉编号 ______________________
细胞株/系：______________________ 冻存日期 ______________________ 冻存者 ______________________
冻存管编号 ______________________ 细胞/冻存管编号 ________________ 于 ______________________mL
生长培养基 ______________________ 血清 ____________ 浓度____________ 冻存液 ______________________
降温方法 ______________________ 降温速度 ______________________
解冻记录：

解冻日期	冻存管编号	剩余数量	接种			活性			备注
			浓度	体积	培养基	染料排除	24h 的贴瓶率/%	克隆率	

15.3.9 冻存管的解冻

必要时可将细胞解冻并以一个相对高的浓度进行重新接种以优化复苏，详见方案 15.2。应该

尽快将冻存管解冻以减少升温过程中细胞内冰晶的生长。这些可以在温水内、水桶中或水浴槽内完成，但是如果储存过程中冻存管浸在液氮内、温浴锅必须被盖住，以防冻存管有漏，吸入液氮在升温过程中发生剧烈爆炸（图 15.8）。

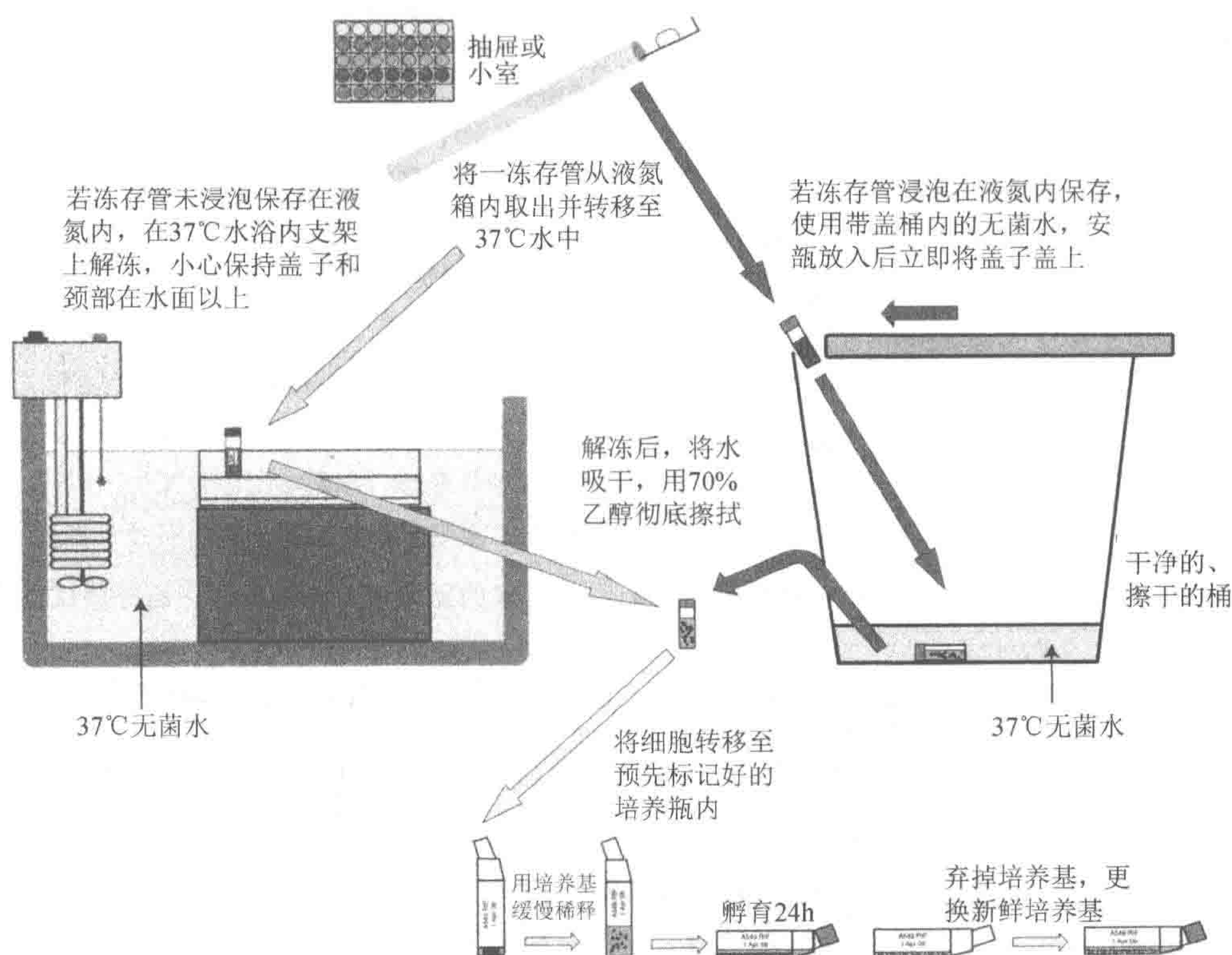


图 15.8 细胞解冻。将冻存管从冷藏箱内取出，在温水内迅速解冻，如果冻存管保存在液相内，则遮盖好以防爆炸（图右侧）。没有被浸泡在液氮中的冻存管可以在水浴槽内解冻（左侧），水位保持在盖子和颈部以下

解冻后，细胞悬液应该被缓慢稀释，因为快速稀释会降低存活性。如果含有 DMSO，逐渐稀释过程更加重要，因为若含有 DMSO，快速稀释会引发渗透损伤并使细胞存活减半。大多数细胞不需要离心，因为次日更换培养基完全能使单层细胞存活，或对悬浮细胞进行稀释也可使其存活。然而，一些细胞（通常是悬浮生长细胞）对冷冻保护剂，尤其是 DMSO 更敏感，因此解冻后必须进行离心，并且依然需要先在培养基内进行缓慢稀释。

染料排除活性和大致收获量（如 24h 后贴壁细胞比例）应该被记录在合适的记录卡或文件上以有助于以后的解冻复苏后 24h，消化并对细胞进行计数，从而对复苏率进行更准确的评估（参见 27.4 节练习 18）。每次新冻存都必须将一个冻存管解冻以检测操作是否成功，并对结果进行记录。

方案 15.2 冻存细胞的解冻

概要

快速解冻细胞，缓慢稀释，以高细胞密度进行重新接种（图 15.8）。

材料

无菌

- 培养瓶
- 离心管（如果需要离心）
- 生长培养基
- 移液管，1mL，10mL
- 移液器，如果用到，头部必须有过滤层
- 注射器和19-G注射针（如果使用玻璃冻存管）

非无菌

- 萘胺黑（酰胺黑），1%；或台盼蓝，0.4%
- 乙醇，70%
- 37℃无菌水

  (i) 如果冻存管被浸泡保存在液氮液相内：10cm深的无菌水装于干净的、乙醇擦拭过的带盖桶内

  (ii) 如果冻存管没有被浸泡保存在液氮中：水没过水浴锅内试管架（适合冻存管的大小）顶部即可，但水不能没过冻存管颈部和盖子
- 接触液氮时，要有适当的安全防护装备
- 实验服
- 隔热手套（例如，VWR公司的低温防护手套）
- 面罩
- 医用镊子
- 医用棉签

操作步骤

1. 核对目录查找待解冻冻存管的位置。
2. 收集所有材料，准备培养基，对培养瓶做好标记。
3. 从冷藏箱内取出冻存管，核对标签确定是正确的冻存管，如果没有被浸泡在液氮中，将其放在烧杯或水浴锅内37℃无菌水中。尽量避免水上升到盖子，因为这将会增加污染的机会。加热块对此很有效，但是热传递可能会更慢。

▲安全提示 当将冻存管从冷藏箱内拿出时，必须穿封闭的实验服并戴手套。如果冻存管被**浸泡**保存在液氮内，也要将**防护面具或护目镜**连同封闭实验服和手套一起穿戴上。冻存管，包括塑料冻存管，储存在液相内可能会吸入液氮，解冻的时候则会剧烈爆炸。这种情况下**必须使用带盖塑料桶进行解冻**以控制各种爆炸（图15.8）。

4. 冻存管解冻后，再次检查标签对细胞进行确定；然后用70%乙醇彻底擦拭冻存管，并在层流洁净罩内将其打开。
5. 带有含过滤头移液器的1mL移液管将冻存管内的东西转移到培养瓶内。

6. 将培养基缓缓加入到细胞悬液中：10mL 于 2min 以内完成，一开始逐滴加入，然后稍微快一点，逐渐稀释细胞和冷冻保护剂。

对于需要离心以去除冷冻保护剂的细胞：

(a) 缓慢稀释细胞，如步骤 6，在离心管或单独容器内进行

(b) 100*g* 离心 2min

(c) 弃去含有冷冻保护剂的上清

(d) 于新鲜生长培养基重悬细胞

7. 种至培养瓶内进行培养。

8. 冻存管内残余的少量细胞可被萘胺黑或台盼蓝染色以检测细胞活性（参见方案 24.1）。

9. 24h 后检查：

(a) 对于单层贴壁细胞，确定贴壁，并根据完全存活有理想密度（细胞数/cm^2）的细胞的照片尝试估算存活率（参见 12.4.1 节、18.4.5 节，彩版 4）。



彩版 4

(b) 对于悬浮培养细胞，检查外观（透明细胞质，无颗粒），并稀释到正常接种浓度。如果细胞经过计数并且经过活性检测（参见 24.3.1 节），可以被稀释到含有活性细胞的正常接种浓度，这样做将会更加精准。

15.3.10 培养瓶冻存

细胞培养到对数期晚期时，整个培养瓶也可以被冻存，加入 5%~10%的 DMSO 到最少量的培养基中，培养基的量以能有效覆盖单层细胞为准，然后将培养瓶放到壁厚 15mm 的延伸型聚苯乙烯容器内（Ohno et al.，1991）。隔热容器被放在–90~ –70℃的冷藏箱内，它将会以约 1℃/min 的速度冷冻。这样可以存活好几个月，只要容器内的培养瓶不从冰箱内取出。24 孔板也可能用同样的方法冻存（Ure et al.，1992），每孔加入约 150μL 冻存液，这样可在鉴定阶段用来保存大量的克隆。

15.3.11 玻璃化保存

虽然慢速降温法适合绝大多数培养细胞系，但是一些细胞，如着床前胚胎和人胚胎干细胞，需要快速降温和玻璃化保存。它们的三维立体结构尽管很小，在慢速降温过程中仍具有扩散限制效应。玻璃化是液态向玻璃态（一种超冷液体）的转化，通过将塑料毛细管或吸管内的细胞急速插入液氮中实现。冷冻保护剂 DMSO 和乙二醇与梯度蔗糖一起使用以增加浓度。

和很多其他细胞一样，人胚胎干细胞可以在液氮中长期保存。虽然其他干细胞可以通过常用的慢冻（1℃/min）速融法（参见方案 26.3-Su）被成功冻存，可至今最常用的冻存 hES 细胞的方法是玻璃化保存（Cooke and Minger，2007；Neubauer et al.，2015）。该方法使用梯度浓缩蔗糖和 DMSO 的冻存液帮助保存细胞，并减少细胞内冰晶的形成。解冻过程非常类似，使用梯度浓度以减少蔗糖和 DMSO 的浓度，从而将细胞缓慢解冻回标准 hES 培养基内。

15.4 冻存库的设计和监控

如果初次细胞培养传代或新获得的细胞系有小量细胞剩余，而且这些细胞未被污染，那么应该冻存几个冻存管，这就是所谓的试样冻存。当细胞系能被成功传代，或者挑选出理想特性的克隆细胞株，并且被证明没有污染，那么接下来则应对该细胞进行保种冻存（图 15.9，表 15.4）。

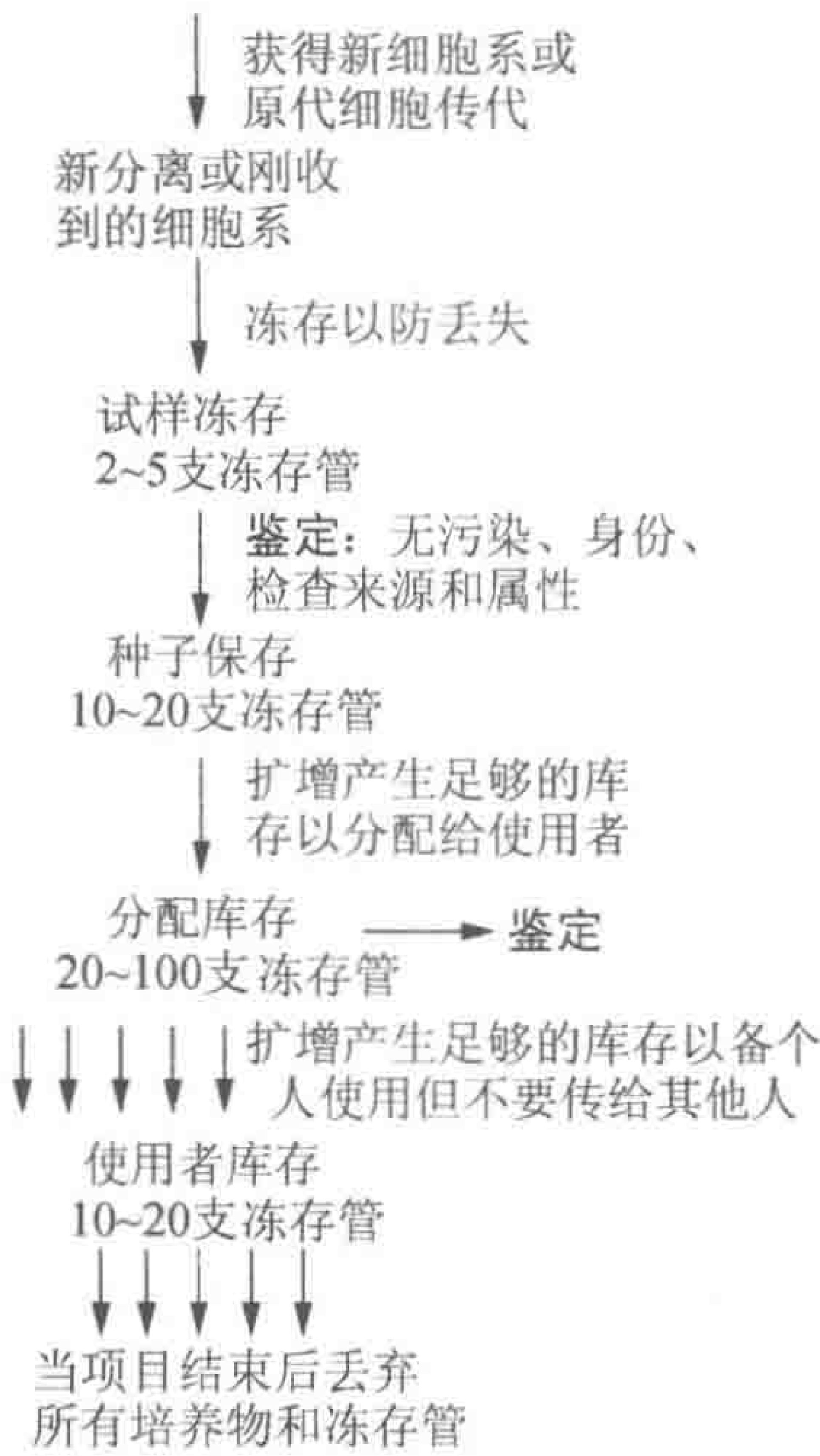


图 15.9 细胞入库。引入的或原代分离而来的新获得的细胞系，当细胞量达到数个冻存管后，应立即将其冻存。接着对库存进行扩增，并进行鉴定，确定无污染，作为可靠的种子进行冻存。将种子库内一支冻存管解冻、扩增，并重新鉴定，然后冻存为分配库存。配送给使用者的冻存管在项目使用期间可以被用来建立使用者库存，但用完后应被丢弃，不能传给其他使用者

表 15.4 细胞系的获得和储存

（a）小型实验室或课题组				
阶段	来源	#冻存管	用途	鉴定
试样冻存	起源处	1~3	仅作安全储存	仅来源处
种子库存	细胞库，原代培养或试样冻存	12（2×6 分批放在不同冰箱内）	安全储存和填补使用库存，缺损时需补足	活性 特性鉴定 转化 污染
运作库存	种子库存	20（5 年项目，细胞库存每 4 年更换一次）	供实验或生产用，不能传给其他使用者	活性 污染 在研究前和完成时文章发表前进行特性鉴定

续表

（b）大型实验室或研究机构				
阶段	来源	#冻存管	分配	鉴定
试样冻存	起源处	1~3	无	仅来源处
种子库存（多个位点）	细胞库，原代培养或试样冻存	36（3×12 分批放在不同位置）	无（只用作填补分库存）	活性 特性鉴定 转化 污染
分库存或运作细胞库（WCB）	种子库存	50~100（根据需要可更多）	使用者，包括其他实验室	活性 污染 特性鉴定
使用者库存（一个机构内各课题组）	分库存	20（5年项目，细胞库存每4年更换一次）	无	活性 污染 在研究前和完成时文章发表前进行特性鉴定

（c）细胞库，大型研究机构或企业				
阶段	来源	#冻存管	分配	鉴定
试样冻存	起源处	1~3	无	仅来源处
主细胞库（MCB），即种子库存（多个位置）	细胞库，原代培养或试样冻存	60（3×20，分批放在不同位置）	无（只用作填补工作库存）	活性 特性鉴定 转化 污染
运作细胞库（WCB），即分库存（多个位置：WCB1，WCB2，WCB3）	种子库存	600（根据需要可更多）（3×200，分批放在不同位置）	课题组，生产厂家，客户	活性 污染 特性鉴定
分库存[如(a)和(b)]，可能建立自己种子库存和工作库存的课题组生产厂家及个人	WCB	20（5年项目，细胞库存每4年更换一次）	仅限同一研究机构内部使用；不能传给其他单位	活性 污染 在研究前和完成时文章发表前进行特性鉴定

15.4.1 库存管理、分配和使用

根据研究团队或者机构的大小，冻存细胞的管理规模也相应地有所不同。小型实验室的种子库可能需要约 12 支冻存管，并应该被保护好，不作常规使用（表 15.4a）。种子库必须进行鉴定（参见 13.1 节），并且无污染（参见 14.3 节）。当复苏冻存的细胞对种子库活性进行检测，或者即将需要使用该细胞系，可以将细胞扩增至所需的量并进行冻存。根据使用需要确定冻存的库存量，当该库存使用完毕，可以从种子库内取一支进行复苏重新建库。必须小心确保不要将种子库用完，并且当还剩下少于 5 支冻存管的时候，应对种子库进行扩充。在项目启动前及完成后，或者处于待发表阶段，都应该对正在使用的库存内的细胞进行鉴定，并排除污染。

大型实验室或者研究机构（表 15.4b），可能会倾向于建立中心细胞库（central cell bank，CCB）。原始库存、试样冻存库，或者权威的国家/国际细胞库来源的细胞，都必须进行扩增，建立种子库，其规模应大于小型研究团队的种子库，并且应该冻存在 2 个或者以上的不同地方（位于不同的冰箱，甚至不同的大楼，或者单位以外）。CCB 的组织者会进行鉴定和无污染检测，并且从种子库内建立分库，分给最终使用者。长期使用库存的个人应该建立自己的使用者冻存库，工作结

束后，该库应该被丢弃。使用库存不应该传递给另一个使用者，因为该库存没有被完全鉴定；新的使用者应该从分配库存内申请细胞或冻存管。当分配库存被用完时，可以从种子库存内进行填补。当种子库存少于5个冻存管时，应该在这些冻存管被使用前进行填补，且应使用初次冻存后扩增代数最少的细胞。

国家或国际细胞库，大型研究机构，以及大型企业会遵守相似的原则（表15.4c）。获得细胞系后会先建立试样冻存库，随后形成大型种子库，即主细胞库（master cell bank，MCB）。MCB的细胞经过了鉴定和无污染检测，并且可能对其特殊属性进行了检验。会有很多个MCB分散在不同的地点，有些可能位于机构以外。MCB的细胞将用于建立一个或更多的运作细胞库（working cell bank，WCB），放置在不同的冰箱。WCB冻存或者培养的细胞会被分给委托人、客户或者其他大型实验室或企业的研究团队。随后，接收细胞的机构应根据使用规模，建立自己的细胞库，具体可参考表15.4a或表15.4b。理论上，这些细胞库应仅限一个机构使用，当细胞库或其他实验室提供细胞时，通常会在物品转让协议内提到这一点。一些特定情况下，细胞系可以被转让，但只有在发布了许可证确保可靠和无污染的情况下才可以进行转让，并且只能从分库，而绝不能从已使用的库存内进行转让。

15.4.2 细胞库存的连续更换

库存的细胞应该从冷藏箱内定期替换，以减少基因漂变和表型变异的影响。细胞系培养2个半月后，从明确的库存内或者运作细胞库（WCB）内解冻另一管，并将其扩增以替代现有库存。如果细胞从冷藏箱内拿出来3个月之久，则丢弃现有库存，并更换新的库存（图15.10）。对于倍增时间（PDT）约24h的细胞，每隔3个月就要重复一次这样的程序；PDT更短或更长的细胞系则可能分别需要更短或更长的时间间隔。

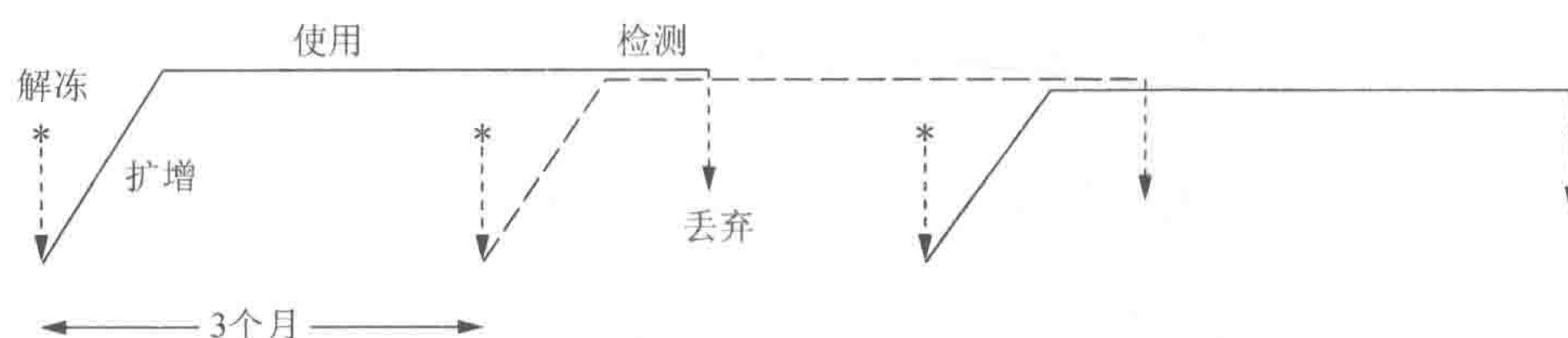


图15.10 细胞的连续更换。将一冻存管解冻并扩增至正常使用所需的量，并持续3个月。初次解冻3个月后，解冻一支新的冻存管并扩增，对比现有库存进行鉴定后，将其替代现有库存，而现有库存则被丢弃。整个过程应每隔3个月重复一次，这样细胞的使用不会超过3个月

15.5 细 胞 库

有一些细胞库（表15.5，又见补充材料中的附录III）是用来安全储存和分配已鉴定细胞系的（ICLAC，细胞库）。因为很多细胞系是受到专利限制的，尤其是杂交瘤细胞系和其他基因修饰的细胞系，所以，这对于安全专利储存也是必需的。细胞库有其特定的使用指南（OECD）。

通常，最好从规范的细胞库内获得你的首次种子库存，因为那里具有必要的鉴定和质量管理。另外，非常建议你向细胞库内存入你获得的或者产生的有价值的细胞，因为这会保护你防止丢失，并且可以分配给其他人，除非你希望分配受限，这点你可以明确表示。

大多数细胞库也会将它们的目录信息放在网上作为主要的信息来源。也有一些数据库能在网上查到，它们含有用户自己实验室所拥有的细胞系的信息（Romano et al.，2009）（表 15.5）。这类数据库增加了大量的潜在资源。然而，必须记住从其他实验室获得的细胞系的特征和质量区别会很大，收到时也必须进行适当的鉴定。

一些研究所机构内部也能够提供基因组信息和突变信息的数据库，如 Sanger 研究所（COSMIC 数据库）和 Broad 研究所（Cell Line Encyclopedia，细胞系百科全书）。这些研究机构会对他们所收集的细胞系进行鉴定，并且在网上发布 STR 和 SNP 数据。大型细胞库和 NCBI 上也能提供人类细胞系的 STR 信息（参见 13.1.5 节）。

表 15.5 细胞库和其他资源

细胞/数据库	性质	网站
美国模式培养物收集中心（ATCC）	细胞库和数据库；DNA STR database	www.atcc.org
生物资源与信息通用集（CABRI）	协会	www.cabri.org
澳大利亚细胞库	细胞库和数据库	www.cellbankaustralia.con/
科里尔细胞库（CCR）	细胞库和数据库	http://ccr.coriell.org
德国微生物菌种保藏中心（DSMZ）	细胞库和数据库；DNA STR 在线分析	www.dsmz.de/
欧洲细胞培养物收集中心（ECACC）	细胞库和数据库	www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp
ICLAC 交叉污染获错误鉴定细胞系数据库	未鉴定细胞系清单	http://iclac.org/databases/
日本生物资源研究收集中心（JCRB）	细胞库和数据库	http://cellbank.nibio.go.jp
健康科学研究资源库（HSRRB）	分销服务	www..jhsf.or.jp/English/index_e.html
NCBI 生物样本数据库	人类细胞系 DNA STR 文件	www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/
NIH 干细胞组（NIHSCU）	干细胞库和信息服务	http://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit
RIKEN	基因和细胞库	www.riken.go.jp/engn
英国干细胞库（UKSCB）	干细胞库	www.ukstemcellbank.org.uk
WiCell	干细胞库	www.wicell.org/

15.6 细胞的运输

细胞可以以冻存管或活细胞两种形式从一个实验室转移到另一个实验室，两种形式都需要注意以下几点。

（1）细胞寄出之前，提前通知接收者。

（2）传真或电邮以下说明：

（a）收到后要做什么；

（b）需要哪种培养基和血清；

（c）任何所需特殊添加物；

(d) 传代方法；

(e) 冻存操作指南；

(f) 特殊的安全注意事项；

(g) 最后一次鉴定时间和方法；

(h) 最后一次微生物，尤其是支原体污染检测的时间和方法。

(3) 将细胞的数据表和说明的文本粘贴在外包装上以便接收者打开前知道如何操作。

(4) 附上一份数据表，包括上述第（2）点内的操作详情，并提供鉴定和无污染的证明。

(5) 如果需要，附上一份物品转让协议：

(a) 细胞及其产物的使用限制；

(b) 发表论文或报告时，致谢的格式；

(c) 细胞能否传给其他人使用（应该禁止这样）；

(d) 所有权、知识产权和专利的详细信息；

(e) 如果是人源的原代细胞，必须提供伦理批件和是否符合人体组织法（UK）或者其他授权的详细信息。

15.6.1 冻存管

冻存管放在含有干冰的厚壁塑料泡沫容器内寄送（图 15.11）。应该根据运输的距离确定盒子的大小。如果是隔夜快递，使用的盒子体积最小约为 18cm×18cm×19cm（7in×7in×7.5in），壁厚 6cm（2.5in），并放入大概 4kg（10lb）干冰来填满中空；如果是跨国运输，至少要用体积为 46cm×46cm×40cm（18in×18in×16in）的盒子，以及 20kg（45lb）干冰（ICLAC，Shipping and distribution of cell line，细胞系运送）。

(1) 由于冻存管会以 10~20℃/min 的速度升温，且不能让其高于–50℃，因此要尽快将其从液氮箱内转移到干冰内。

(2) 将一密封的 30~50mL 聚丙烯离心管放在干冰上预冷降温。

(3) 将冻存管从干冰内取出，用吸水纸巾快速将其包裹起来（防止泄漏），将其放在聚丙烯管内并盖紧盖子，用胶带密封好。

(4) 将离心管放入密封袋内，并迅速放回运输盒的干冰内。

(5) 把盒子内填满干冰，并进行密封。

注意：必须有一个通风口，让二氧化碳逸出。

干冰运输有一定的限制，因此当使用干冰进行配送时，必须告知承运人，并且标签内应包含代码 UN1845。很多网站都有干冰运输的包装和运输说明（如 ICLAC、UCL、Yale、Fedex 和 NCSU）。

如果运输的样品有潜在的生物毒性（参考 Biological Substance Category B），标签应含有代码 UN3373（IATA Packing instructions 650，国际航空运输协会 IATA 包装说明 650）。危险的病原体需要特殊的包装和运输条件，因此，你应该向当地安全委员会和国家相关机构进行咨询（PHE，NCSU）。

也可以使用干式液氮桶对细胞进行运输（如 Taylor Wharton），这是一种含吸热材质的超级隔

热瓶，能够装载液氮。尽管花费更高，并需要承担返回的运输费用，但是这类容器能够保温7天以上。

一到达，冻存管应该被解冻并正常接种（参见方案15.2）。

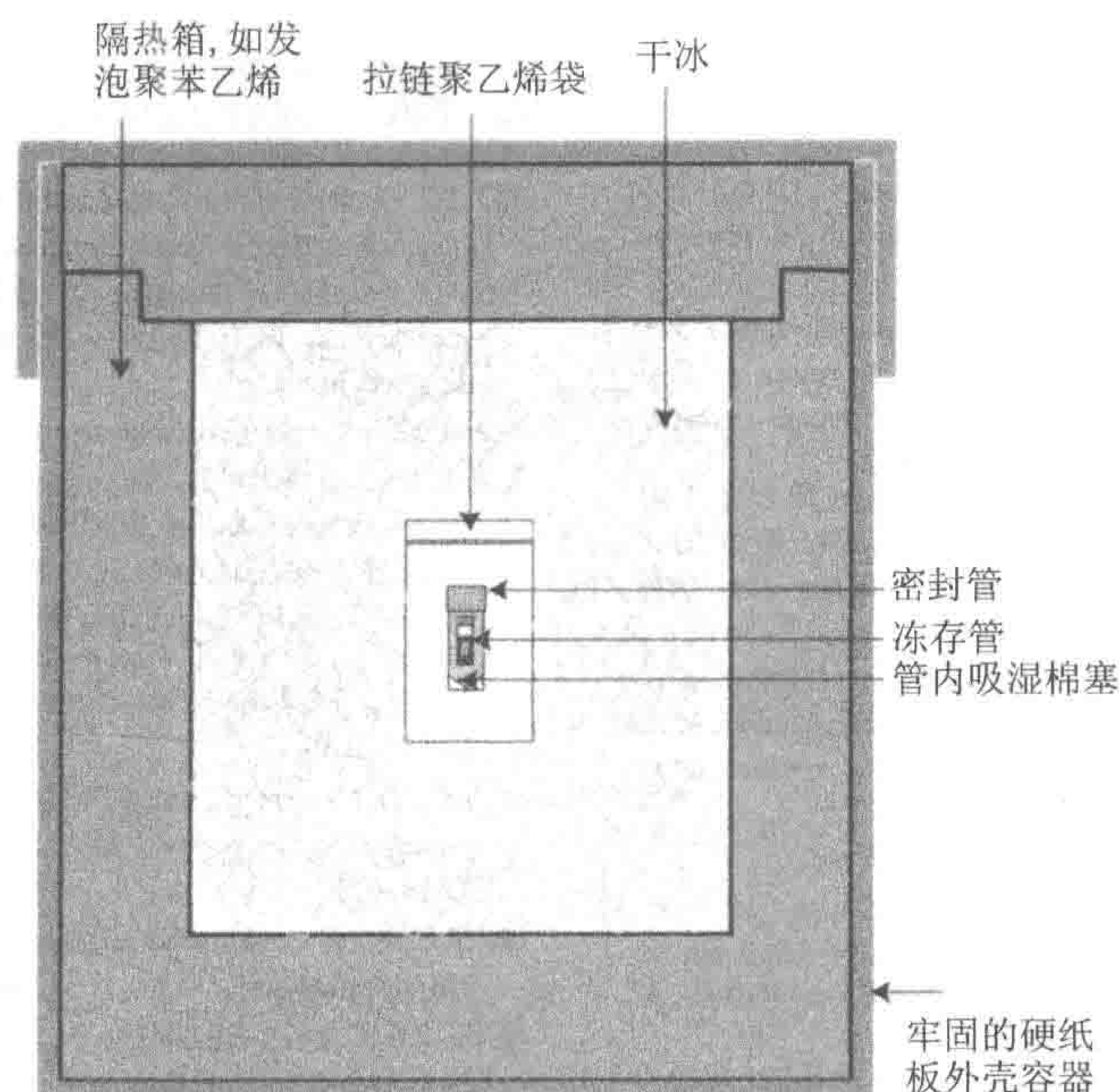


图15.11 细胞的运输容器。细胞以冻存管内冻存细胞或活细胞的形式进行运输。内衬发泡聚苯乙烯的牢固的硬纸盒，装着含有冻存管的干冰，冻存管被吸水棉塞包裹密封在密封管内，密封管被密封在拉链密封袋内，整个拉链密封袋被放置在干冰中央

15.6.2 活细胞

有时也可以以生长活细胞的形式进行运输。细胞应该处于对数期中期或晚期；汇合或汇合后细胞将更快地消耗培养基，运送过程中容易脱落。培养瓶内应该加满培养基，瓶颈部用弹力防水胶带牢牢粘好，并密封于一小聚乙烯袋中。用含有吸水填料的牢固容器将包好的培养瓶包裹起来。接着将该容器密封于一聚乙烯袋中，随后将其放入塑料泡沫或气泡包装内。将其放在含有“易碎”标签的容器内，并用大写字母标记上：DO NOT FREEZE！（不要冷冻！）悬浮细胞可以放在2mL的冻存管或者离心管内，整管装满，用胶带密封好；像包裹培养瓶一样进行包装，不过它们可以放入泡沫保护信封内进行运输，密封好并做好适当的标记：DO NOT FREEZE！（不要冷冻！）。

收到后，将培养瓶从包装内取出，用70%乙醇彻底擦拭，在无菌状态下打开。弃掉大部分培养基，留下生长所需要的量（例如，25cm^{2}培养瓶需5mL），如果需要，对细胞进行培养。初次补液时，也可以将培养基完全弃掉更换新培养基，但保留好初始运输培养基，防止在新培养基内培养出问题。

通常最好是通过专递人员运输细胞，并应向他们介绍包裹内的基本情况，并告知递送的紧急

性。国际邮寄需要和海关协商，专业的货运代理如果熟悉 IATA（国际航空运输协会）关于生物样品进出口运输的条例，有助于抵达时包裹顺利通过海关。运往美国的细胞需要经农业部实行隔离和检测，因此最好通过细胞库 ECACC 或 ATCC 安排此运输。

参考文献

Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C (2000). Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* **40**:110−116.

Bielanski A (2012). A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* **77**:467−482.

Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW (2004). Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev.* **13**:295–305.

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, Macleod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer* **127**:1−8.

Cell line enclycopedia (www.broadinstitute.org/ccle/home).

Cooke JA, Minger SL (2007). Human embryonal stem cell lines: Derivation and culture. In FreshneyRI, StaceyGN, AuerbachJM (eds.) (2007). *Culture of human stem cells.*, Hoboken, NJ: Wiley& Sons, pp. 24−59.

Cornell Univ. (1999). *Chemical hygiene plan* (PDF) (http://people.ccmr.cornell.edu/~cober/complete.chemical.hygiene.plan.2000.pdf).

COSMIC database (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/).

Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, Toner M (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **18**:163–167.

Fedex (2015): *Shipping in dry ice* (http://images.fedex.com/us/services/pdf/Dry_Ice_Job_Aid.pdf).

Foreman J, Pegg DE (1979). Cell preservation in a programmed cooling machine: The effect of variations in supercooling. *Cryobiology* **16**:315–321.

Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, Uhl L, Wheeler C, Antin JH, Churchill WH, Benjamin RJ (1997). Liquid nitrogen freezers: A potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* **37**(6):585−591.

Green AE, Athreya B, Lehr HB, Coriell LL (1967). Viability of cell cultures following extended preservation in liquid nitrogen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **124**:1302–1307.

Grout BW, Morris GJ (2009). Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology* **71**:1079−1082.

Harris LW, Griffiths JB (1977). Relative effects of cooling and warming rates on mammalian cells during the freeze–thaw cycle. *Cryobiology* **14**:662–669.

Hay RJ (2000). Cell line preservation and characterization. In Masters JRW (ed.), *Animal cell culture, a practical approach.* Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 95–148.

Horita A, Weber LJ (1964). Skin penetrating property of drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and other vehicles. *Life Sci.* **3**:1389–1395.

ICLAC (http://iclac.org/databases/).

ICLAC. *Cell banking* (http://www.laboratory-journal.com/science/life-sciences-biotech/iclac-cell-banking).

ICLAC. *Database of cross-contaminated or misidentified cell lines* (http://iclac.org/databases/cross-contaminations/).

ICLAC. *Shipping and distribution of cell lines* (www.laboratory-journal.com/science/life-sciences-biotech/ iclac-shipping-and-distribution-cell-lines).

Itemtracker (www.itemtracker.com/).

Leibo SP, Mazur P (1971). The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*, **8**:447−452.

Lovelock JE, Bishop MWH (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* **183**:1394–1395.

Merten OW, Petres S, Couvé E (1995). A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells. *Biologicals* **23**:185−189.

Monroy B, Honiger J, Darquy S, Reach G (1997). Use of polyethyleneglycol for porcine islet cryopreservation. *Cell Transplant.* **6**:613–621.

NCSU (North Carolina State University): www.ncsu.edu/ehs/dot/Bio_shipping.pdf.

Neubauer JC, Beier AF, Geijsen N, Zimmermann H (2015). Efficient cryopreservation of human pluripotent stem cells by surface-based vitrification. *Methods Mol. Biol.* **15**;1257:321−328.

OECD. *Guidelines for biological resource centres* (www.oecd.org/sti/biotech/oecdbestpracticeguidelinesforbiologicalresourcecentres.htm).

Ohno T, Saijo-Kurita K, Miyamoto-Eimori N, Kurose T, Aoki Y, Yosimura S (1991). A simple method for *in situ* freezing of anchorage-dependent cells including rat liver parenchymal cells. *Cytotechnology* **5**:273–277.

Parker KA (2011). Storage of cell lines. *Methods Mol. Biol.* **731**:27−34.

Pasch J, Schiefer A, Heschel I, Dimoudis N, Rau G (2000). Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers. *Cryobiology* **41**:89–96.

PHE (Public Health England) (2013). *Transport of specimens to the laboratory* (http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714084352/http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733789145.

Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D (2009a) Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil. Steril.* **94**(4):1181−1188.

Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B (2009b). Cell line database: Structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Res.* **37**(database issue): D925−D932.

Rowley SD, Byrne DV. (1992). Low-temperature storage of bone marrow in nitrogen vapor-phase refrigerators: decreased temperature gradients with an aluminum racking system. *Transfusion* **32**:750–754.

Suzuki T, Saha S, Sumantri C, Takagi M, Boediono A (1995). The influence of polyvinylpyrrolidone on freezing of bovine IVF blastocysts following biopsy. *Cryobiology* **32**:505–510.

Tomlinson M, Sakkas D (2000). Is a review of standard procedures for cryopreservation needed? Safe and effective cryopreservation-should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? *Hum. Reprod.* **15**:2460–2463.

UCL. *Shipping in dry ice* (www.ucl.ac.uk/haemostasis/Shipping%20with%20Dry%20Ice.doc).

UN337. *IATA packing instructions 650* (www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/DGR52_PI650_EN.pdf).

Ure JM, Fiering S, Smith AG (1992). A rapid and efficient method for freezing and recovering clones of embryonic stem cells. *Trends Genet.* **8**:6.

Wewetzer K, Dilmaghani K (2001). Exposure to dimethyl sulfoxide at 37 degrees C prior to freezing significantly improves the recovery of cryopreserved hybridoma cells. *Cryobiology* **43**:288–292.

Yale Univ *Shipping in dry ice* (ehs.yale.edu/sites/default/files/dryice%20(1).pdf).

（黄 姗 译）

第16章

克隆培养及筛选

目前组织培养的主要问题是某特殊细胞类型的分离及其特性的保持。环境条件对于维持培养中特定细胞的分化特性尽管发挥着重要作用（参见 19.1 节、19.7 节），但非特定细胞及错误类型细胞选择性过度生长仍然是一个比较棘手的问题。此外，许多连续的细胞系具有明显的异质性（参见 17.3 节），因此有必要针对特定细胞世系的需求，研制选择性培养条件。实际操作中，可能有两套选择性条件，一套便于正确谱系细胞的扩增，另一套诱导这些细胞表达分化表型（参见 19.3 节、20.1 节）。某些情况下，尤其是对于异质性强的连续细胞系（参见 22.2 节），以及遗传修饰如融合的杂交瘤或转染或永生化的细胞，分离出表达正确特性或产品的克隆株是必要的。

16.1 细胞的克隆培养

传统的微生物学方法解决培养中异质性问题是利用克隆培养分离纯的细胞株。这种技术对于连续细胞系相对容易，但对于绝大多数原代培养的细胞来说，由于克隆培养成功率低而受到限制。但原代培养物的克隆培养也可以成功：睾丸支持细胞（sertoli cell）（Zwain et al.，1991）、肾的肾小球球旁细胞（Muirhead et al.，1990）和肾小球细胞（Troyer and Kreisberg，1990）、肝卵圆细胞（Suh et al.，2003）、骨骼肌星状细胞（Zeng et al.，2002；McFarland et al.，2003；Hashimoto，2004），以及从成体干细胞中分离不同谱系的细胞（Young et al.，2004）。

正常组织原代培养的另一个问题是细胞只能存活有限的几代（参见 2.7.3 节、22.3.1 节），当克隆培养达到所需细胞数目时，细胞也许已经接近衰老（图 16.1）。多数情况下，要想将克隆培养作为有效方法，有限细胞系需要先进行永生化（Walters et al.，2013]。此外，连续细胞系虽然比有限细胞系克隆培养成功率高，但克隆细胞培养后使用时仍可产生显著的异质性（参见 22.2 节，图 22.1 及彩版 7）。尽管如此，克隆培养依然有助于减少培养物的异质性。



彩版7

克隆培养也作为存活能力的检测（参见 23.10 节、24.3.2 节）用于优化生长条件（参见 9.6 节、10.6.3 节）和测定细胞的化学及放射敏感性（参见方案 24.3）。

贴壁细胞的克隆培养可以用培养皿、多孔板或培养瓶进行。单个细胞所形成的克隆比较容易识别。显微操作是唯一公认的方法，可确定集落的真克隆源性（也就是说一个集落是来源于一个细胞）。如果从一种单细胞悬液衍生同样的集落，尤其是在早期就检测到这种集落的形成，那么这些集落就是真克隆的可能性很大。

细胞的克隆培养也可以将细胞铺在有底层琼脂和琼脂糖的凝胶（如琼脂或琼脂糖）或黏性溶液［如美希索（methocel）］中悬浮进行。凝胶的稳定性或美希索的黏滞性确保子代细胞不脱离集

落。即使单层细胞克隆培养时有些贴壁差的细胞系如 HeLa-S_3 和 CHO，细胞可从形成的集落脱离形成子代集落，致使克隆形成率（计算）错误。用美希索而不铺底层，使细胞沉到塑料表面进行克隆培养，可将错误降至最低。造血细胞通常是在悬浮培养条件下进行克隆培养，根据其细胞种类和所使用的生长因子，所形成的集落可在体内或体外产生增殖能力很强的未分化细胞，或成熟为由分化造血细胞构成的、增殖能力很弱的集落，这种情况下细胞克隆培养成了一种检测细胞增殖潜能和鉴定干细胞特性的方法。

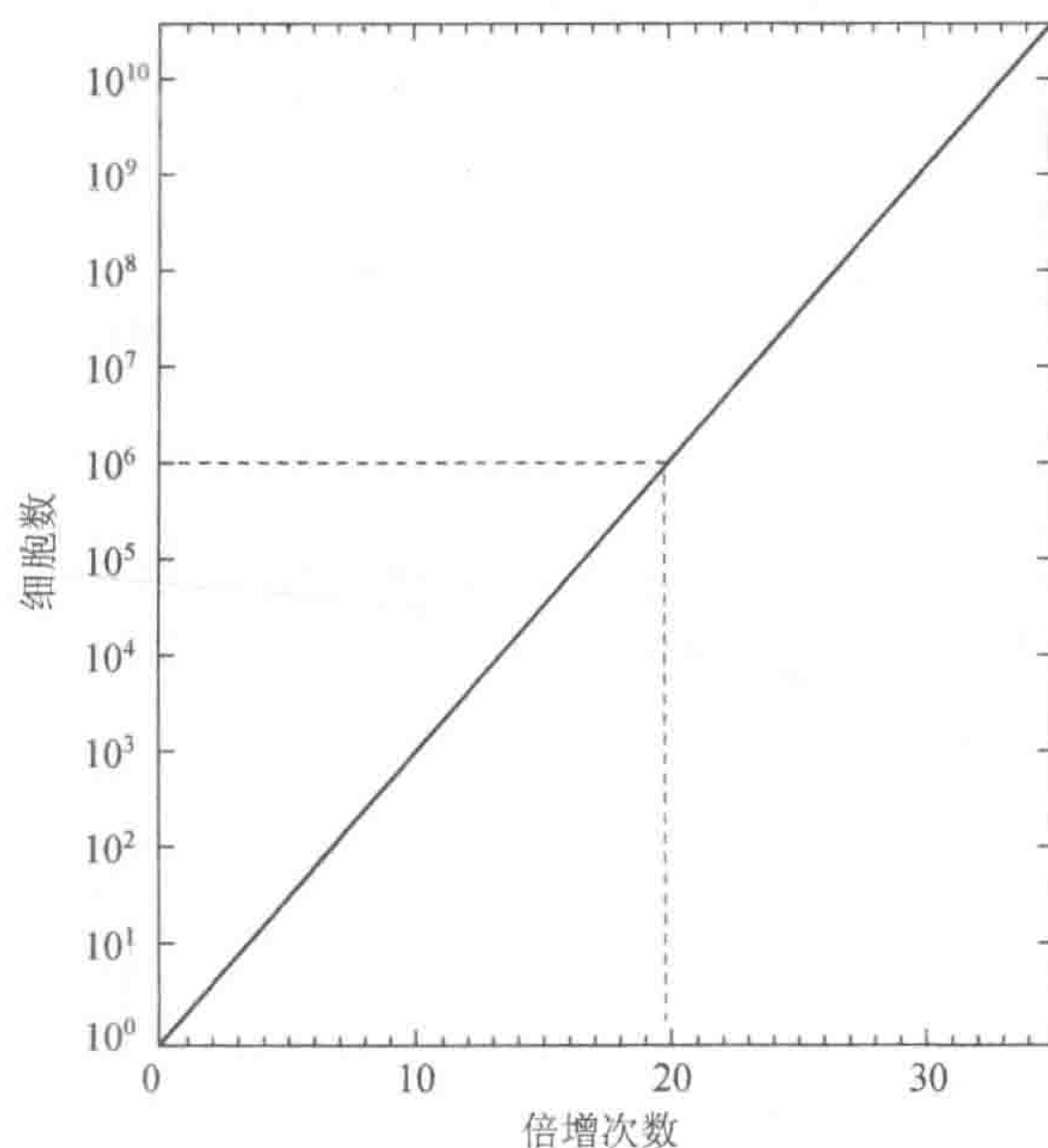


图 16.1 克隆细胞产量。一个克隆集落细胞产量与群体倍增数之间的关系；例如，20 次倍增可以生成 10^6 个细胞

连续细胞系的细胞由于发生了转化，在贴壁或悬浮克隆培养时通常具有很高的克隆形成率；正常细胞由于需要贴壁和伸展才能生长，贴壁培养的克隆形成率相当高，悬浮培养时克隆形成率非常低。这一区别用来通过悬浮克隆培养检测细胞的转化（参见 22.4.1 节）。悬浮培养克隆形成率高意味着转化。悬浮培养克隆形成低可能提示干性而不是转化，但这一可能性尚未经实验证实。

稀释法克隆培养（Puck and Marcus，1955）是应用最广泛的方法。它是基于以下观察：将细胞稀释至低于一定密度进行培养，最终能够形成单独的集落。可用实验方案 16.1 进行练习（参见 27.4 节练习 20）。

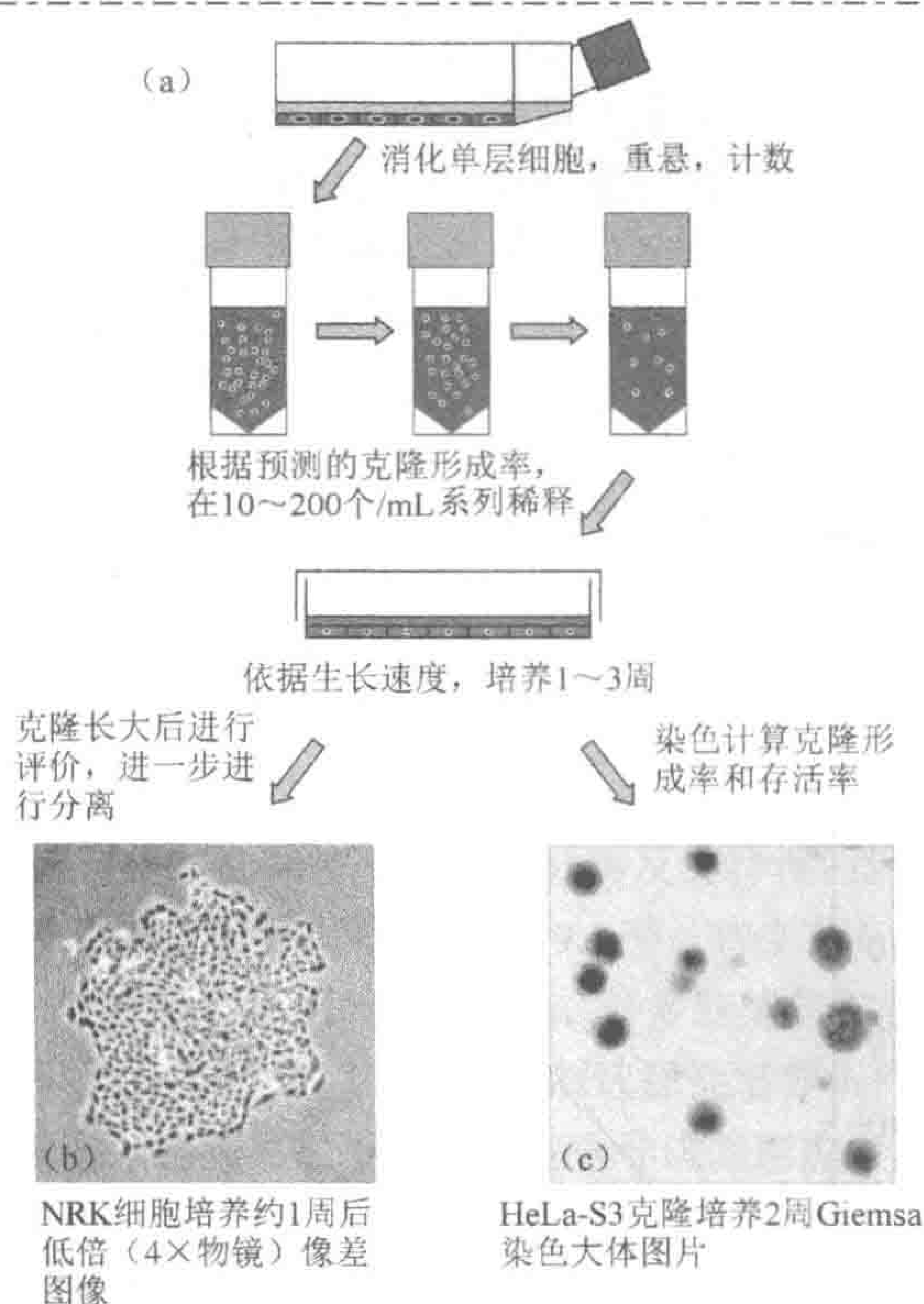
方案 16.1 稀释法克隆培养

概要

低密度接种细胞，培养至集落形成（图 16.2），细胞染色（用于克隆形成率和存活检测；见方案 18.3、方案 23.10、方案 24.3；彩版 6a、e）或用于筛选时分离细胞集落，然后扩增为细胞株（参见方案 16.6）。



彩版6



彩版6

图 16.2 稀释法克隆培养。细胞来自消化的单层贴壁细胞（a），经过计数和充分稀释可产生独立分开的克隆。克隆形成后（b）（较大的适于分离），可以分离培养（图 16.8、图 16.9）。如果不需要分离培养，只用于定量分析（参见方案 23.10 和方案 24.3），可以将集落固定，染色（c），计数（亦见彩版 6a、e）

材料

无菌或无菌制备

- 细胞（如 CHO-K1），25cm^2 培养瓶，对数生长晚期
- 培养基：Ham F12，5% CO_2 平衡，10% FBS
- 胰蛋白酶，0.25%，1∶250 或相当活性（参见附录Ⅰ）
- 吸管，1mL、5mL、10mL 和 25mL
- 培养皿，直径 6cm，1 包
- 试管或通用的器皿，稀释用

非无菌

血细胞计数板或电子细胞计数仪

操作步骤

1．细胞用胰蛋白酶消化制备单细胞悬液（参见方案 12.3）。消化不充分会形成细胞团；过度消化会降低细胞活性。就克隆培养而言，细胞呈单个悬浮状态是基础。如果是第一次克隆培养新的细胞系，有必要摸索一下消化时间和不同的配方（表 12.4），以确保能消化成单个悬浮细胞获得最佳克隆形成率。

2．在细胞消化期间，给培养皿编号（写在培养皿底上），分出每步稀释用培养基，也许有必要经过

4次稀释才能将原来单层细胞稀释至适于克隆培养的浓度。

3. 待细胞变圆开始脱落时，加入5mL含血清或胰蛋白酶抑制剂的培养基终止消化，分散细胞。

4. 细胞计数，将细胞悬液稀释至1×10^5个/mL，然后再稀释至每个平皿可产生50个集落的浓度（表16.1）。对CHO-K1细胞而言，是每毫升10个细胞，稀释步骤如下。

(a) 将消化后细胞稀释至1×10^5个/mL（约1∶10或1∶20，视培养瓶中细胞数而定）。

(b) 取1×10^5个/mL细胞悬液200μL，加至20mL（1∶100），成为1×10^3个/mL。

(c) 将1×10^3个/mL细胞悬液200μL，加至20mL（1∶100），成为1×10个/mL。如果想变换克隆培养条件，如一系列血清浓度、不同的血清或生长因子，此时准备一系列试管，分别在每管中加入200μL 1×10^3个/mL。

表16.1 接种密度与贴壁效率的关系

预期贴壁率（%）	需接种的最佳细胞数			
	1mL	$1cm^2$	每皿，6cm	每皿，9cm
0.1	1×10^4	2×10^3	40 000	100 000
1.0	1×10^3	200	4 000	10 000
10	100	20	400	1 000
50	20	4	80	200
100	10	2	40	100

5. 如果是第一次克隆培养测定克隆形成率，选择试用每毫升中10、50、100、200和2000个细胞进行实验（参见方案23.10）。

6. 接种3个平皿，每个平皿中5mL培养基含末次稀释浓度的细胞。建议接种每毫升含2000个细胞的平皿作对照，确认细胞已加入，以防浓度再低时无法形成克隆。

7. 将培养皿放在透明的塑料盒中。

8. 将塑料盒放置于湿润的CO_2温箱中或通气的密闭容器中（2%~10% CO_2，见8.2.2节）。

9. 静置培养1周以形成克隆。

(a) 克隆形成率分析（亦见方案23.10）；进行染色和计数集落（参见方案18.3和彩版6）。

(b) 克隆筛选；单个集落的分离（参见方案16.6）。


彩版6

10. 如果没有可见集落，更换培养基后再培养1周，若仍没有集落形成，还可以换培养基后培养至第3周，再没有集落出现，则不可能再有集落出现。

胰蛋白酶 除CHO-K1外，可能需要测试不同活性的不同胰蛋白酶或用其他蛋白酶（参见表12.4；16.2.1节），但需确认能获得单个细胞悬液。

换液 由于克隆培养期间细胞密度很低，因此目前对一周换一次液的做法有分歧。换液的主要目的是弥补丢失掉的不稳定的营养物质（如谷氨酰胺）、补充降解或耗尽的生长因子及补偿蒸发消耗。因为换液同时也增加了污染的危险，所以两周时再换液是合理的，如果有必要培养3周则需更换培养基，或至少半量换液。

不均一分布 形成的集落倾向于在培养皿的中央，可能是因为接种方法有误，将细胞种到已有培养基的培养皿的中央或摇匀培养皿时使细胞趋向集中于中央，也可能是温箱风扇（如果用了风扇的话，不推荐使用风扇）马达不平衡导致的共振作用造成的，或者过多的开、关温箱所致（参阅7.3.5节）。

微孔培养板 如果克隆培养的主要目的是分离不同的集落，那么将细胞种在微量滴定培养板

上效果会更好（图 16.3），克隆长起来后容易分离。但是在培养早期必须注意观察，标记好那些真正有单克隆的孔。在统计学上将接种细胞的密度降至每 5 或 10 个孔中一个细胞，可提高单孔单克隆的可能性。例如，表 16.1 中，每毫升含 100 个细胞，若克隆形成率为 10%，每毫升会有 10 个集落形成，或者每 0.1mL 有 1 个集落。例如，在微量滴定培养板中，每孔种 0.1mL，会形成 1 个集落。如果将细胞浓度降至每毫升 10 个细胞，理论上 10 个孔中只会有 1 个孔能形成 1 个集落，每孔中多于 1 个集落的可能性很小。

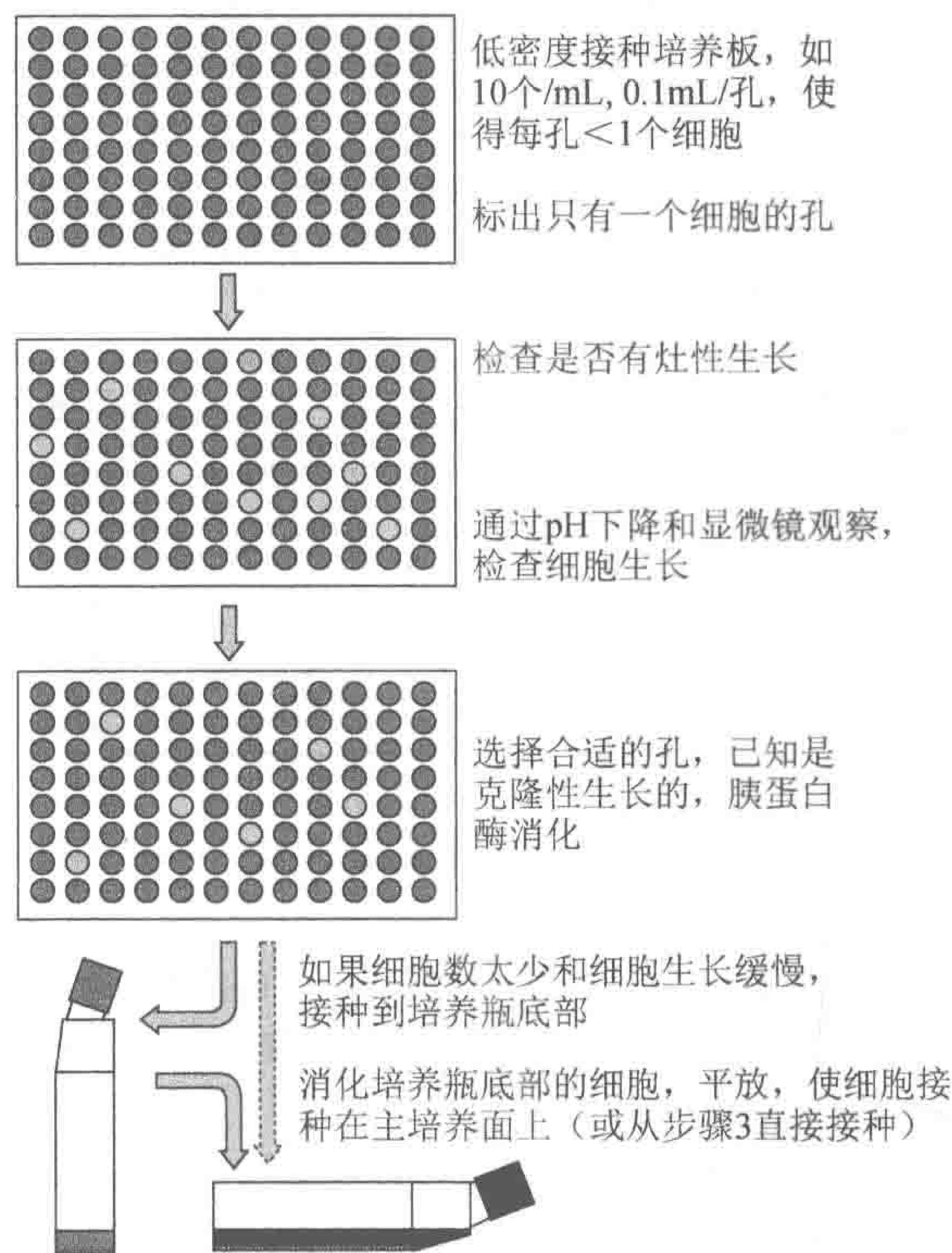


图 16.3 微孔板克隆培养。细胞以足够低的浓度接种，使每孔少于 1 个细胞，那样的话有些孔中会只有一个细胞。接种后几个小时，通过显微镜观察可找出只有一个细胞的培养孔。标出这些孔，跟踪观察，pH 下降表示细胞生长，通过显微镜观察确认，胰蛋白酶消化分离集落

16.2 贴壁率的刺激

细胞低密度培养时，除了个别细胞系，细胞生存率降低。在连续细胞系中一般不是严重问题，其贴壁率很少低于 10%；而原代培养的细胞和有限细胞系克隆形成率可能非常低，为 0.5%~5%，甚至为 0。为提高贴壁率，人们根据推测做了大量尝试：细胞密度过低时，细胞需要更多的营养物质，由于渗漏而丢失或者是由于细胞高密度培养时产生的可扩散性信号、调控因子在细胞密度低时消失或太稀了。在高密度群体里，释放的胞内代谢池很快会和周围培养基达到平衡，而孤立的一个细胞就永远做不到。这一原理成为 Sanford 等（1948）发明的毛细管技术的基础。利用此技术首次培养出 L 细胞的 L929 克隆株。毛细管本身能为细胞营造出类似于细胞较高密度状态下的局部环境。以后出现微滴技术，同样营造了细胞高密度状态，可以将细胞形成微滴种在液体石蜡下培养，每个集落与其他集落分开。另外，培养基质的改进也使克隆形成率得到提高，Puck

和 Marcus（1955）证实将单纯稀释（描述见方案 16.1）的细胞培养在经射线照射过的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上（参见方案 16.3），获得了令人满意的克隆效率。

人们还推测培养的细胞群体中能形成克隆的细胞是该群体中的干细胞。因此在成体组织中，其数量会很低。如果真是那样，从克隆中再克隆，贴壁率应该更高，但通常并非如此。这可能是因为干细胞与群体中的其他细胞处于平衡状态，在一个克隆株中，这种平衡重新建立，或者简单地说是克隆形成细胞不等同于干细胞。

16.2.1 促进克隆生长的条件

（1）培养基。选择营养丰富的培养基，如 Ham's F12；或者选用针对使用细胞类型的最适培养基。例如，MCDB110（Ham，1984）适于人的成纤维细胞；Ham's F12 或 MCDB302 适于 CHO（Ham，1963；Hamilton and Ham，1977）（参见 8.6 节、9.5 节，表 9.1、表 9.2 及第 25 章）。

（2）血清。如果需要使用血清，通常胎牛血清优于小牛血清或马血清。选择试用时贴壁率高的批号（参见方案 23.10，彩版 6e）。



（3）激素。胰岛素，1×10^{-10}IU/mL，可以提高数种细胞类型的贴壁率（Hamilton and Ham，1977）；地塞米松，2.5×10^{-5}mol/L（10μg/mL），一种可溶性的、合成的氢化可的松类似物，可以提高鸡成肌细胞、人正常胶质细胞、胶质瘤细胞（图 16.4a）、成纤维细胞和黑色素瘤细胞的贴壁率，如果培养 5 天后撤掉地塞米松，可以增加克隆的生长（集落大小）（Freshney et al.，1980a，1980b）。表皮细胞，如肺癌细胞，更适于较低浓度的地塞米松（如 10^{-7}mol/L）（图 16.4b）（见 25.2.1 节、25.2.3 节、25.2.6 节）。

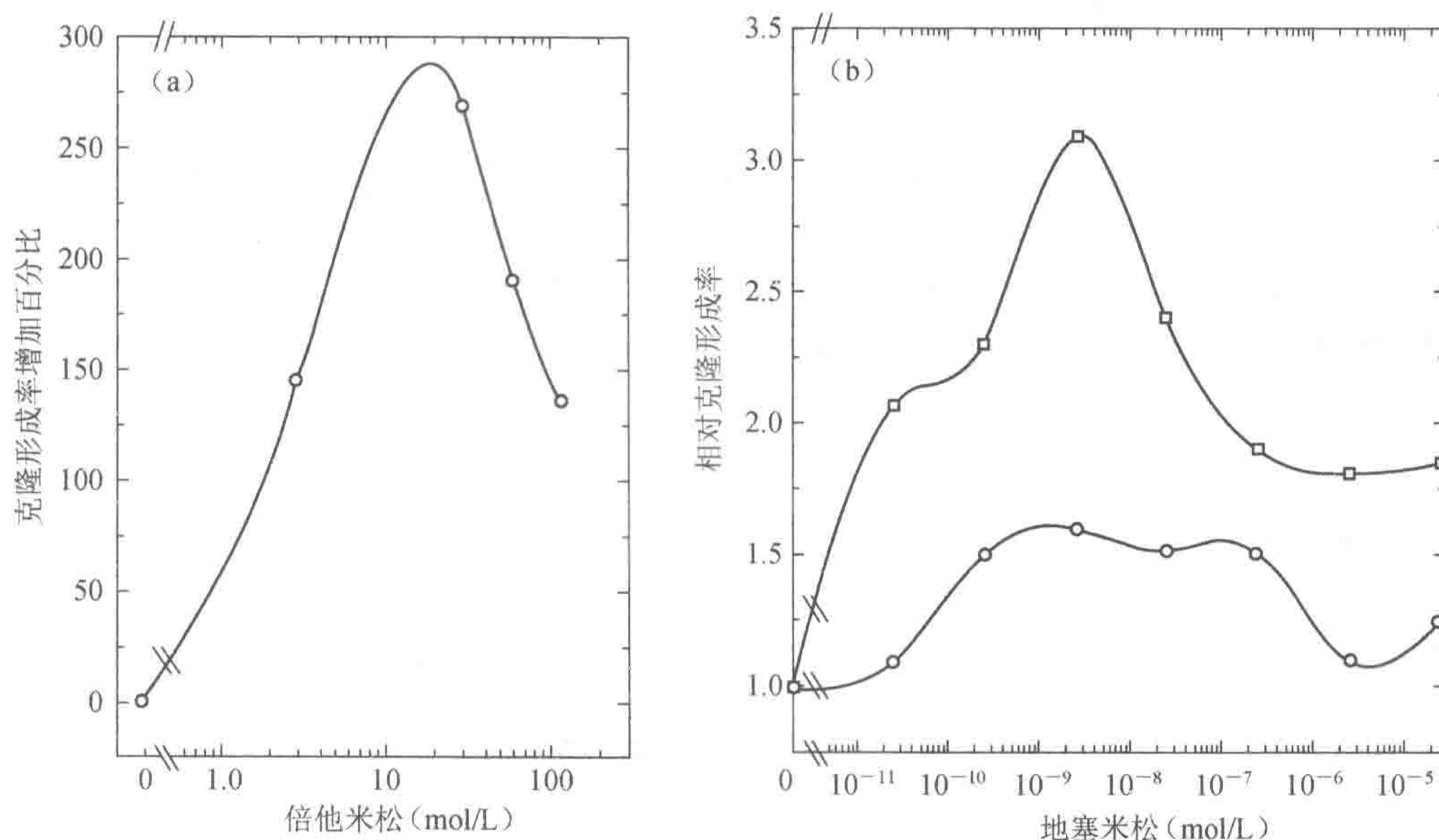


图 16.4 糖皮质激素对克隆的影响。皮质醇类似物能提高多种细胞的克隆形成率。（a）倍他米松和胶质瘤细胞系；（b）地塞米松和 SKMES-1（方形）及 A549（圆形）人非小细胞肺癌细胞系

（4）中间代谢产物。Oxo-酸（以前称酮酸），如丙酮酸或 α-酮戊二酸（Griffiths and Pirt，1967；McKeehan，1979）和核苷（α-MEM，Stanners et al.，1971）作为辅助介质已经添加在营养丰富的培养基配方中，如 Ham's F12。丙酮酸还添加到 DMEM 中（Dulbecco and Freeman，1959）。

（5）二氧化碳。对于大多数细胞来说，要获得最大的克隆效率，CO_2是必需的。通常使用5% CO_2；而对于很多细胞用2% CO_2就足够了，并且2% CO_2对人神经胶质细胞和成纤维细胞可能会更好些。2% CO_2条件下，可用HEPES（20mmol/L）保护细胞，避免换液过程中及CO_2供应出现问题时pH波动。使用2% CO_2也减少了CO_2的消耗。另一个极端是DMEM通常搭配10% CO_2，常用于培养骨髓杂交瘤克隆制备单克隆抗体（尽管可能不总是在一个较高的碳酸盐或二氧化碳浓度水平上）。如果CO_2的张力改变，碳酸氢盐的浓度必须调整，才可使pH平衡在7.4（参见表8.1）。

（6）基质的处理。在血清浓度低的状态下，多聚赖氨酸可以提高人成纤维细胞的贴壁率（McKeehan and Ham，1976a）（参见7.2.1节）。

（a）在培养瓶中用超纯净水（UPW）溶解1mg/mL的多聚右旋赖氨酸（约5mL/25cm^2）。

（b）移去多聚赖氨酸，用D-PBSA 5mL/25cm^{2}清洗培养瓶，培养瓶可以立即使用或者可以存放几周。

纤连蛋白也可以提高很多细胞的贴壁率（Barnes and Sato，1980）。培养瓶可用含有5μg/mL纤连蛋白的培养基预处理（参见方案25.9-Su）。

（7）胰蛋白酶。纯化的胰蛋白酶（经两次结晶），用量0.05μg/mL，可能优于粗胰蛋白酶，但观点不一。Mckeekan（1977）发现4℃消化细胞后（用纯化的胰蛋白酶），贴壁率显著提高。重组胰蛋白酶TrypZean™（Sigma-Aldrich）和TrypLE™（Life Technologies）的引入，提供了使用高纯度、非动物源性胰蛋白酶的机会。Life Technologies公司称TrypLE™可促进A549细胞（有血清）和MDCK细胞（无血清）的贴壁率。要注意的是，胰蛋白酶的特异活性可能会改变，意味着其浓度需要做相应调整（参见附录Ⅰ）。

16.2.2 条件培养基

曾经培养过其他细胞生长的培养基，获得了来自这种细胞的代谢产物、生长因子、基质产物，可作为条件培养基。已有许多种不同细胞用作条件细胞，如小鼠胚胎成纤维细胞（参见方案11.1、方案11.6）可以培养多种细胞类型，又如5637膀胱癌细胞、Mo-T T白血病细胞及WEHI-3小鼠单核细胞白血病细胞可以培养造血前体细胞（Drexler，2004）。这种条件培养基加入常规生长培养基中能提高某些细胞的贴壁率。条件培养基的制备见方案16.2。

方案16.2 条件培养基的制备

概要

收集对数生长晚期的同源或异源细胞系的培养基，过滤，根据需要用新鲜培养基稀释。

材料

无菌或无菌制备

- 条件细胞：同一种细胞、其他细胞系（如3T3细胞），或小鼠胚胎成纤维细胞（参见方案11. 1、方案11.6、方案11.7）
- 克隆用培养基：Ham's F12，加10% FBS或适合待克隆细胞的培养基

- 除菌滤器：0.45μm 或 0.22μm，过滤瓶

操作步骤

1. 条件细胞生长至50%汇合。
2. 更换培养基，继续培养48h。
3. 收集培养基。
4. 离心，1000*g*，10min。
5. 0.45μm 无菌过滤器过滤（培养基可以先经过5μm和1.2μm过滤器预先过滤，见方案10.16-Su）。
6. 将条件培养基–20℃保存。
7. 用前解冻，按照如下比例加在克隆培养用培养基中：1份条件培养基加2份克隆培养用培养基。

可变条件

（1）条件细胞类型。小鼠胚胎成纤维（MEF）细胞、布法罗大鼠肝细胞（Buffalo rat liver，BRL）或者STO经常用来培养干细胞（参见方案26.2-Su），3T3-L1用来培养角化细胞，肿瘤基质成纤维细胞用来培养肿瘤细胞，5637细胞用来培养白血病细胞（参见方案26.10-Su）。

（2）生长阶段。条件细胞应处于平台期而不是对数生长期，并且在细胞达到汇合前开始。

（3）培养时间。延长培养时间到4天。

（4）收集。贴壁细胞可多次收集后混合。

离心、冻存、解冻、过滤，这些步骤都有助于避免从原培养瓶中携带细胞。如果克隆培养的细胞与条件细胞是同一种细胞，这个问题就轻一点。但是用不同细胞系或原代小鼠成纤维细胞作为条件细胞可能更有利于克隆培养。如果用这种方法建立细胞株，细胞的性质必须经过鉴定（参见13.1.4节），排除因条件培养基而引起的细胞交叉污染。

16.2.3 饲养层细胞

有些细胞克隆培养不好的原因与它们在低密度下没有能力生存有关。要使细胞在克隆性生长的密度下生存，同时模拟高细胞密度的环境，一种方法是让细胞在生长停止的饲养层细胞中克隆培养（图16.5）。饲养层细胞可以提供营养物质、生长因子和基质成分，这些能使克隆培养的细胞更容易生存。饲养层的准备见方案16.3。

方案16.3 饲养层的准备

概要

在待测细胞克隆培养之前，接种同源或异源细胞（如来自小鼠胚胎的细胞，用射线照射或药物作用使其失去增殖能力），中等密度。

材料

无菌或无菌制备

- 原代培养的13天胎龄小鼠胚胎成纤维细胞（参见方案11.6、方案11.7）

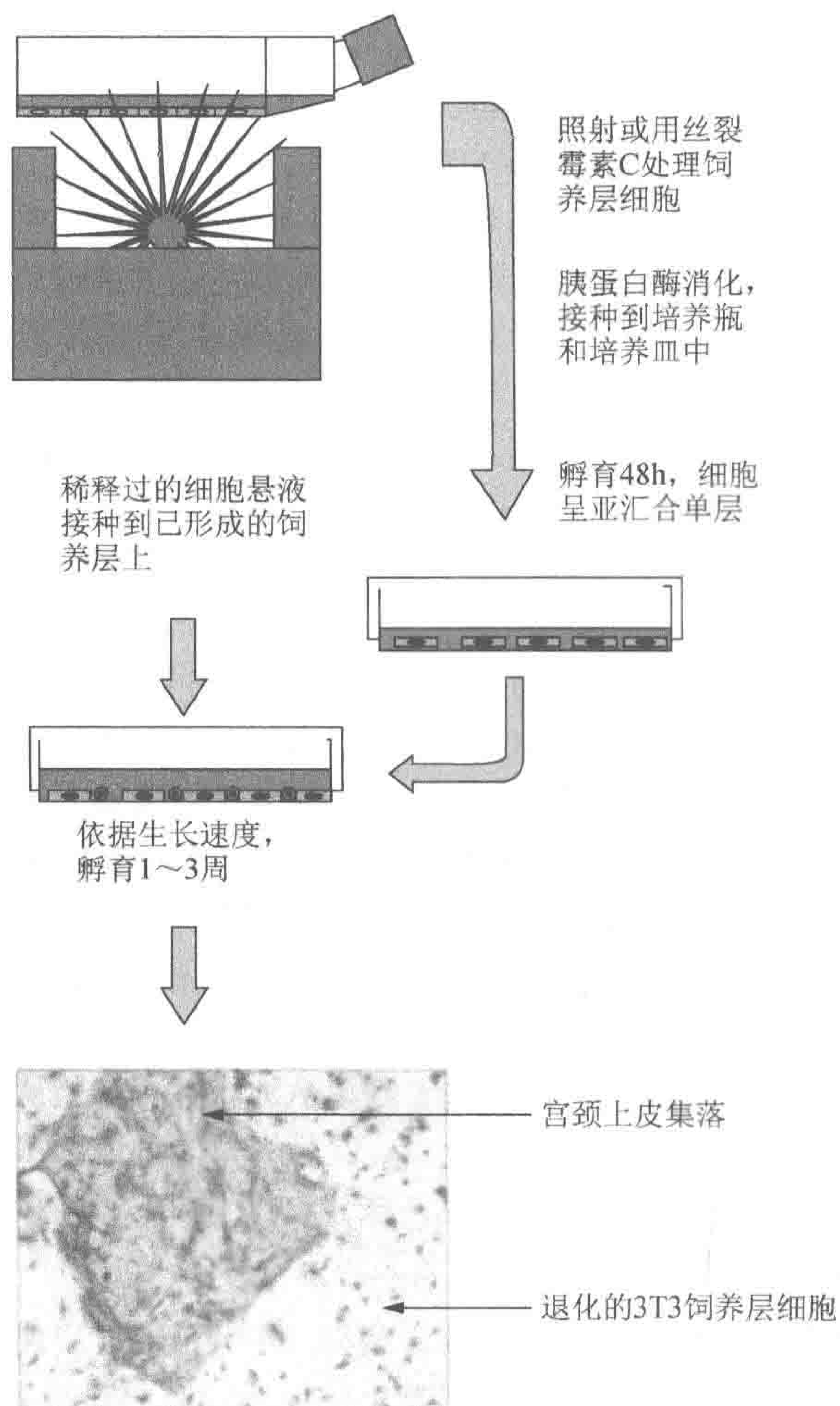


图 16.5 饲养层。细胞经过照射和消化（或先消化，悬液中再照射，或用丝裂霉素 C 处理），低密度接种，以利于促进克隆形成（M. G. Freshney 图）

- 克隆培养用培养基
- 丝裂霉素 C，100μg/mL 储存液，溶于 HBSS 或无血清培养基中

非无菌

X 射线或 ^{60}Co 源，能在 30min 或更短时间内释放 30Gy（可以取代丝裂霉素 C）

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化原代培养的胚胎成纤维细胞，以每毫升 10^5 个细胞再种入培养瓶中。
2. 3~5 天后（细胞亚汇合并且仍分裂）用以下其中之一的方法阻止进一步分裂。

（a）通过放射：

（i）原培养瓶中，以 60Gy 照射细胞，用 X 射线机或 γ 射线源，如 ^{60}Co。

（ii）消化后细胞悬液，以 60Gy 照射细胞，用 X 射线机或 γ 射线源，如 ^{60}Co，然后以 1×10^5 个/mL 接种，或将照射过的细胞保存在 4℃，最长到 5 天。

（b）通过丝裂霉素 C 处理：

（i）以终浓度0.25μg/mL将丝裂霉素加到接近汇合的细胞中（约1×10^5个/mL），37℃过夜（约18h）（Macpherson and Bryden，1971），更换培养基。

（ii）胰蛋白酶消化后的悬液1×10^7个/mL中加入丝裂霉素C，终浓度为20μg/mL（相当于2μg/10^6个细胞），37℃孵育1h，离心清洗（4×10mL）去除丝裂霉素，再以1×10^5个/mL接种（Stanley，2002）或4℃保存，可到5天。

3．再培养24~72h后，胰蛋白酶消化，再接种在新的培养基中；或直接接种保存的细胞，接种浓度5×10^4个细胞/mL（10^4个细胞/cm^2）。

4．继续培养24~48h，种入克隆培养的细胞。

Macpherson和Bryden（1971）认为丝裂霉素C与细胞的比例应为2μg/1×10^6个细胞，适用于以上两种丝裂霉素处理方式。在丝裂霉素C处理后细胞进入细胞周期是很重要的，不然DNA损伤可能会被修复。对处于平台期的高密度单层细胞进行处理一般会出现抵制。总之，要点是任何用这种方法分离的克隆株都要进行身份鉴定（参见13.1.4节）以防止受抑制的饲养层细胞过度生长的可能性。

当条件正确时，饲养层细胞最多存活3周，最终将死亡，到分离细胞集落时，不会掺进饲养层细胞。不同或同种细胞系都可以提高克隆形成率，但接下来要分离克隆培养的细胞的话，选择异源细胞更好，因为通过染色体分析、同工酶分析或DNA条形码，就可以除去来自饲养层细胞的偶然污染（参见13.1.4节）。其他用作饲养层细胞的还有3T3、MRC-5和STO细胞。低代数的小鼠胚胎细胞比已建系的细胞能产生更多的基质成分。但确定哪一类细胞是最佳饲养细胞，唯一方法是通过实验筛选。丝裂霉素C处理的饲养层细胞可在4℃保存1周（与Wigley C的私人通信），或者也可以冻存（参见方案15.1和方案15.2）。

细胞对放射和丝裂霉素C的敏感性可能不同，因此欲克隆培养之前，需进行实验，以确保饲养细胞不能存活（参见27.4节练习20，实验变动3）。即使如此我们仍建议当在饲养层细胞上进行克隆培养时，只以饲养细胞接种2或3板饲养层作为对照组。

16.3 悬浮克隆培养

有些细胞，尤其是造血干细胞和病毒转化的成纤维细胞，悬浮培养时容易形成集落。为了保持集落聚集，防止不同集落混杂，将细胞悬浮在琼脂或美希索中，并将细胞接种在底层琼脂凝胶的表面或未经组织培养处理的培养皿内，详见方案16.4和方案16.5。

方案16.4 琼脂中克隆培养

由Mary Freshney提供，当时他在Beatson Institute for Cancer Research，Garscube Estate，Switchback Road，Bearsden，Glasgow，G611BD，United Kingdom工作（参见图16.6）。

概要

温度高时琼脂呈液态，但在37℃时呈凝胶状态，细胞悬浮在温暖的琼脂凝胶培养基中，待琼脂形成凝胶后进行培养，形成散在集落，很容易分离（图16.10）。

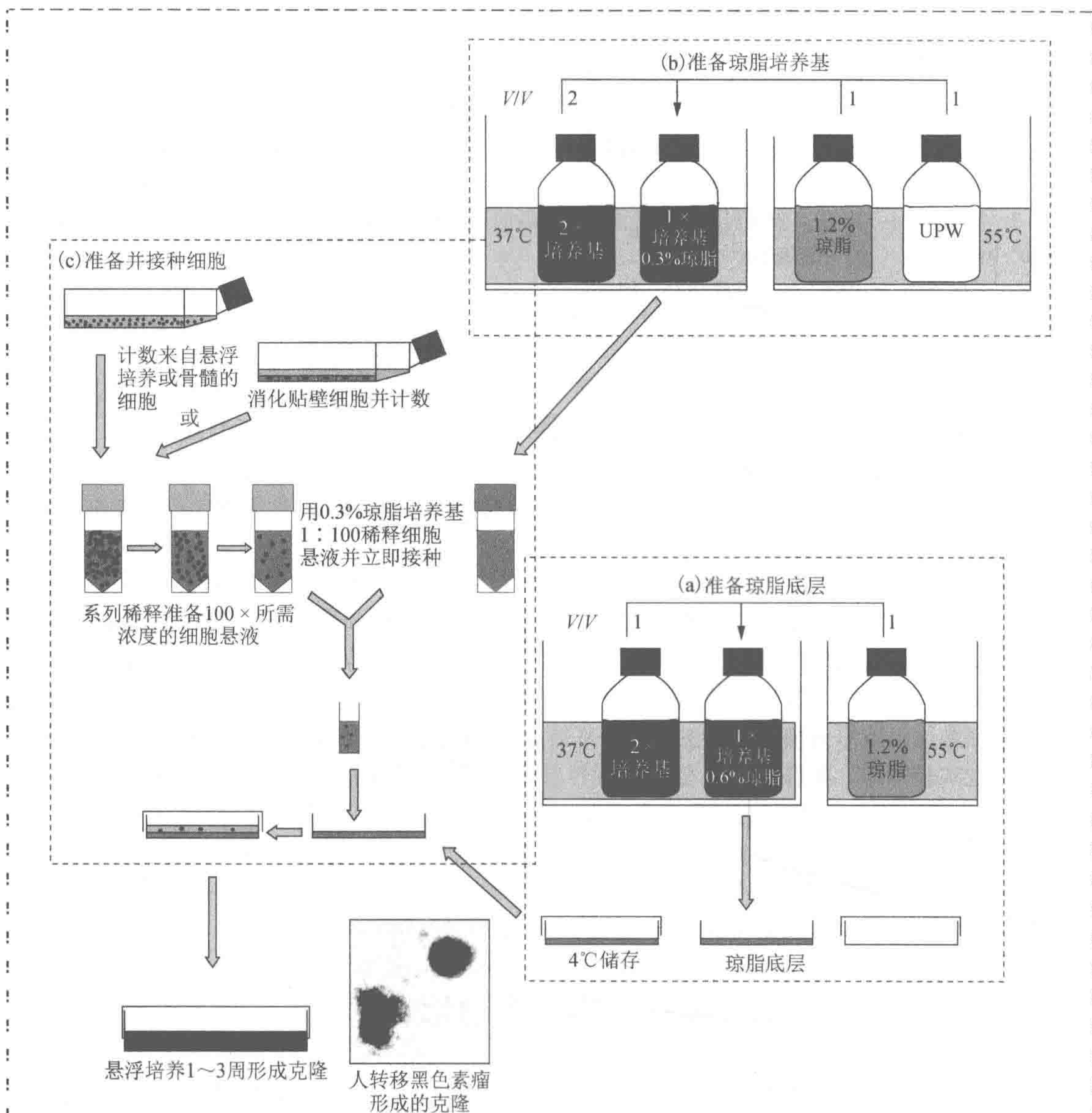


图 16.6 琼脂中的悬浮克隆培养。培养的细胞或取自骨髓或肿瘤的原代悬浮细胞，悬浮于其后形成凝胶的琼脂或低熔点的琼脂糖中，形成悬浮的克隆集落。为了防止细胞与培养皿底部黏附，需要铺一个底层。（a）制备琼脂底层，55℃的 1.2%琼脂与 37℃的 2×培养基混合后，立即加到培养皿中。在室温或 4℃条件下待其形成凝胶；（b）琼脂培养基的制备。1.2%的琼脂和 UPW 均在 55℃与 2×培养基混合，制备 0.3%的克隆培养用琼脂。若使用低熔点的琼脂糖，所有溶液均可保持 37℃，但是这种琼脂糖形成凝胶会更困难；（c）悬浮培养的细胞、来自骨髓的细胞或是胰蛋白酶消化的单层培养细胞进行计数和系列稀释，最终用琼脂或琼脂糖稀释，接种到底层琼脂上

材料

无菌

- Noble 琼脂，Difco

- 两倍浓缩培养基（即 Ham's F12、RPMI1640、DMEM 或 CMRL1066）。用 10×培养基配制 2×培养基，取半量所需终液量，加两倍浓度的血清
- 胎牛血清（需要的话）
- 生长培养基，1×，用于细胞稀释
- 无菌超纯净水（UPW）
- 无菌锥形瓶
- 吸管，包括用于吸取琼脂溶液的一次性无菌塑料吸管
- 通用容器，小玻璃瓶或者离心管，稀释细胞用
- 3.5cm 培养皿，非组织培养级

非无菌

- 本生煤气喷灯和三角瓶
- 55℃水浴
- 37℃水浴
- 电子细胞计数仪或血细胞计数板
- 托盘

注意事项 准备培养基和细胞之前，先算出细胞稀释度，在培养皿上做好标记，检测一个细胞系的克隆形成率时，为每种稀释度的细胞分别准备 3 个培养皿。每个 3.5cm 培养皿适宜接种的细胞数是 1000、333、111 和 37 个，也就是依次 3 倍地稀释细胞悬液。如果需要加入生长因子、激素或其他添加剂，应加在下层的 0.6%琼脂中。

操作步骤

1. 在培养皿底皿的侧面编号或做好标记，将培养皿放在托盘中，很方便。
2. 准备含 40% FBS 的 2×培养基，保持 37℃。
3. 称取 1.2g 琼脂。
4. 分别在无菌锥形瓶和另一个无菌瓶中加 100mL 无菌 UPW。将 1.2g 琼脂放入锥形瓶中，盖好，煮沸 2min。另一种方法是，提前高温灭菌琼脂。但若已保存起来，使用时仍需煮沸溶解或微波炉融化备用。
5. 将煮沸过的琼脂和有 UPW 的瓶放到 55℃水浴中。
6. 2×培养基和 1.2%琼脂等量混合制备 0.6%琼脂底层（图 13.6），保持 37℃。如果需要任何的生长因子、激素或其他添加物，应在此时添加至底层琼脂培养基内。

注意事项 如果需要测定生长因子的活性滴度或选择不同因子，在铺底层琼脂之前向培养皿内加入所需量的因子。

7. 在培养皿中加入 1mL 0.6%的琼脂培养基，摇匀，确保培养基覆盖整个培养皿底。置于室温定型（图 16.6a）。
8. 制备细胞悬液，计数（图 16.6c）。
9. 准备 0.3%琼脂培养基，保持 37℃。此培养基可以用 37℃的 2×培养基、55℃ 1.2%琼脂和 55℃的 UPW 以 2∶1∶1 的比例混合制备（图 16.6b）。
10. 制备以下稀释浓度的细胞，使细胞的最大浓度为 1×10^5/mL：

（a）1×10^5个/mL；

（b）将1×10^5个/mL 稀释 3 倍成3.3×10^4个/mL；

（c）将3.3×10^4个/mL 稀释 3 倍成1.1×10^4个/mL；

（d）将1.1×10^4个/mL 稀释 3 倍成3.7×10^3个/mL。

11．将 4 种稀释液的浓度分别标在 4 个小玻璃瓶或试管上，从每种稀释液中吸出 40μL，包括1×10^5个/mL 细胞液，分别放入相应容器内，37℃加 4mL 0.3%琼脂培养基，混匀，再从每个容器中吸出 3 个 1mL 分别加在相应的 3 个培养皿上（图 16.6）。最终浓度如下（每皿）：

（a）1×10^3个/mL；

（b）330 个/mL；

（c）110 个/mL；

（d）37 个/mL。

注意事项 加细胞之前，确保上层琼脂培养基有足够的时间冷却至 37℃。

12．待培养皿中的溶液在室温下形成凝胶状态。

13．将培养皿放置在一个带盖的清洁塑料盒中，37℃加湿温箱中培养 10 天。

琼脂糖可以代替琼脂，它少了硫酸多糖的含量。有些类型的琼脂糖形成凝胶的温度较低，很容易在 37℃条件下操作。在 4℃形成凝胶后，再回到 37℃培养。

由于细胞与融化的琼脂混合，处理起来很复杂，而且在琼脂中可能会掺杂一些杂质，因此有些实验室倾向于用美希索——一种黏性溶液，而非凝胶（Buick et al.，1979）。加温时，美希索的黏滞性会更高，并且由于它是溶液，不是凝胶，细胞会在其中缓慢下沉，因此在使用美希索时培养瓶底必须铺有琼脂层。集落会在美希索与琼脂层（或琼脂糖）的交界面上形成，使集落之间处于相同的聚焦平面，易于分析和照相。

方案 16.5 美希索中克隆培养

概要

将细胞悬浮在含美希索的培养基中，将这种细胞种于铺有琼脂（或琼脂糖）凝胶底层的培养皿中（图 16.7）。

材料

无菌

- Noble 琼脂（BD Bioscienes）或琼脂糖
- 2×的培养基（如 Ham's F12、RPMI1640、DMEM 或 CMRL1066）。用 10×培养基配制 2×培养基，配出所需终体积的半量，加两倍于正常浓度的血清（如果需要）
- 胎牛血清（如果需要）
- 生长培养基，1×，用于细胞稀释
- 1.6%甲基纤维素（美希索的化学名称，译者注），4Pa-s（4000cps），以 UPW 溶解，置于冰上（另

见附录Ⅰ：甲基纤维素）

- 无菌超净水（UPW）
- 无菌锥形培养瓶
- 吸管，包括可吸取琼脂溶液的无菌塑料吸管
- 通用容器，小玻璃瓶，或者离心管
- 3.5cm 培养皿，非组织培养级
- 注射器，用于分装美希索（由于黏稠，美希索会附着于吸管内壁，造成分装量不准确）

非无菌

- 本生煤气喷灯和三角瓶
- 55℃水浴
- 37℃水浴
- 电子细胞计数仪或血细胞计数板
- 托盘

操作步骤

1. 按照方案 16.4 中步骤 1~7 制备琼脂凝胶底层。
2. 用等体积 2×培养基稀释美希索至 0.8%，充分混匀，冰上保存。
3. 胰蛋白酶消化单层贴壁细胞，或收集悬浮细胞或骨髓细胞，计数。
4. 制备以下稀释浓度的细胞，细胞的最高浓度为 1×10^5 个/mL。
   （a）1×10^5 个/mL；
   （b）将 1×10^5 个/mL 稀释 3 倍成 3.3×10^4 个/mL；
   （c）将 3.3×10^4 个/mL 稀释 3 倍成 1.1×10^4 个/mL；
   （d）将 1.1×10^4 个/mL 稀释 3 倍成 3.7×10^3 个/mL。

美希索有黏性，用不带针头的注射器更容易操作。

5. 将 4 种稀释度分别标在 4 个小玻璃瓶或试管上，从每种稀释度中吸出 40μL，包括 1×10^5 个/mL 这个浓度，分别放入相应容器内，再向每个容器中加 4mL 0.8%美希索培养基，用漩涡混旋器充分混匀，如果细胞特别娇气，用注射器上下轻柔地抽吸溶液几次，然后用注射器再从每个容器中吸出 3 个 1mL 分别加在相应的 3 个培养皿中（图 16.7）。最终浓度如下（每皿）：
   （a）1×10^3 个/mL；
   （b）330 个/mL；
   （c）110 个/mL；
   （d）37 个/mL。
6. 将培养皿放置在加湿的温箱中培养至集落形成。由于集落会在琼脂与美希索的界面形成，因此培养 1 周后添加新鲜培养基 1mL/皿或孔，2 周后在不影响集落的情况下，弃旧液，更换更多新鲜培养基。

很多推荐用于单层贴壁细胞克隆培养的培养基辅助成分也适用于悬浮细胞的克隆培养。另外，硫氢化合物，如巯基乙醇（50μmol/L）、谷胱甘肽（1mmol/L）、α-硫酸甘油（75μmol/L）（Iscove et al.，1980），有时也用于克隆培养。Courtenay 等（1978）在培养基中加入小鼠红细胞，并且证明低氧状态可以促进克隆培养。问题可能是自由氧的毒性，加入红细胞，氧结合在血红蛋白上。也可用高氟碳模拟这种情况（Lowe et al.，1998）或缺氧状态（参见短篇综述 8.1）（Lengner et al.，2010）。

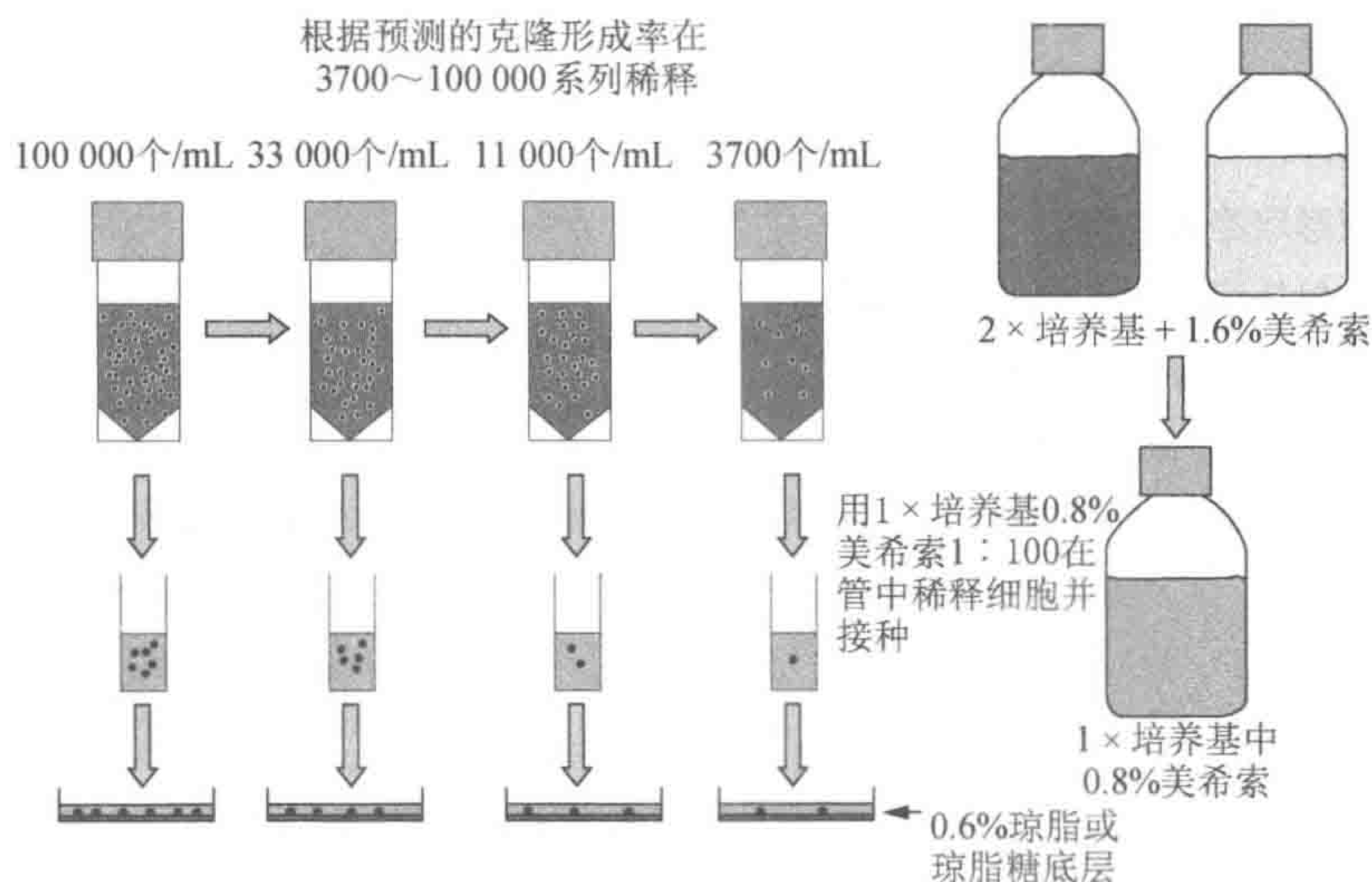


图 16.7 美希索中的悬浮克隆培养。与准备琼脂克隆培养中相同，系列稀释的细胞悬液按 1：100 的比例以美希索培养基稀释，接种到非组织培养级塑料培养皿或铺有琼脂底层的培养皿中

大多数细胞类型悬浮克隆培养比贴壁克隆培养效率更低，有些细胞能低 2~3 个数量级，但是分离细胞集落要容易得多。

16.4 细胞克隆的分离


彩版 6


彩版 7

当克隆培养用于筛选特定的细胞株时，形成的集落（参见彩版 6、彩版 7）就需要分离出来，进一步扩增。如果单层贴壁细胞直接在多孔板上克隆培养（参见方案 16.1），那么集落可以用胰蛋白酶在各自的孔中消化分离。集落形成过程中有必要定期用显微镜观察，确定其克隆起源。但是如果在培养皿中克隆培养，集落之间就没有了物理分隔，所以必须创造一个分隔条件，可以在撤掉培养基后，在要分离的细胞集落周围安放一个不锈钢环或陶环，以达到分隔目的（图 16.8），详见方案 16.6。厚壁的玻璃环（Fisher or Bellco）或塑料环（从厚壁的尼龙、硅胶或特氟龙管切制）也可以用。不管什么材质，底一定要平滑，以便于硅油与培养皿底粘封，且内径要够圈住一整个集落，外径又不遮盖邻近的集落。

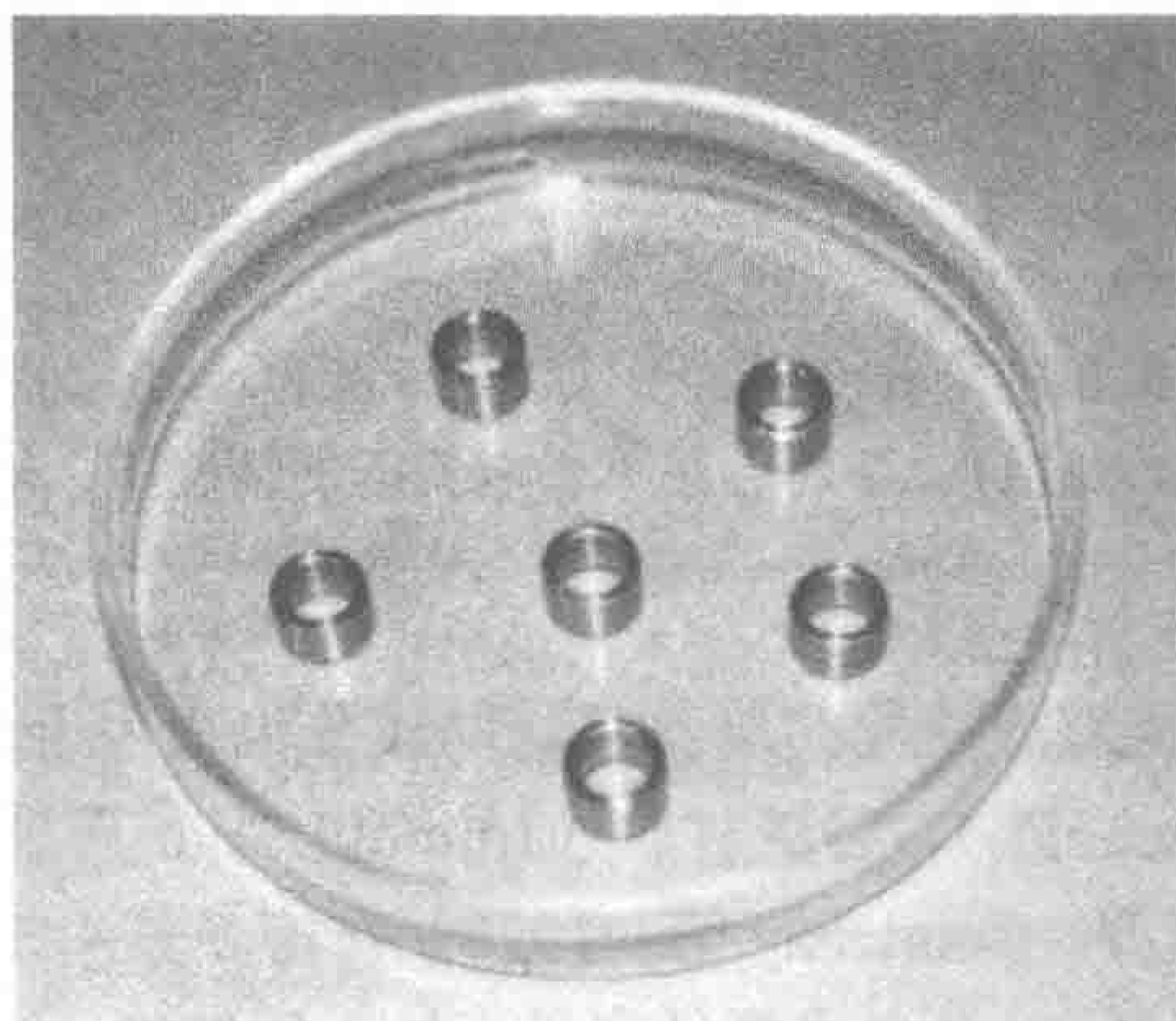


图 16.8 克隆培养环。不锈钢环，用管子切割制成，放在 9cm 玻璃平皿中

方案 16.6　用克隆环分离细胞克隆

概要

将集落在瓷制克隆环、玻璃环、PTFE 环或者不锈钢环中，用胰蛋白酶消化后移至 24 孔或 12 孔板中的一个孔或者直接种于 $25cm^2$ 的培养瓶内（图 16.9）。

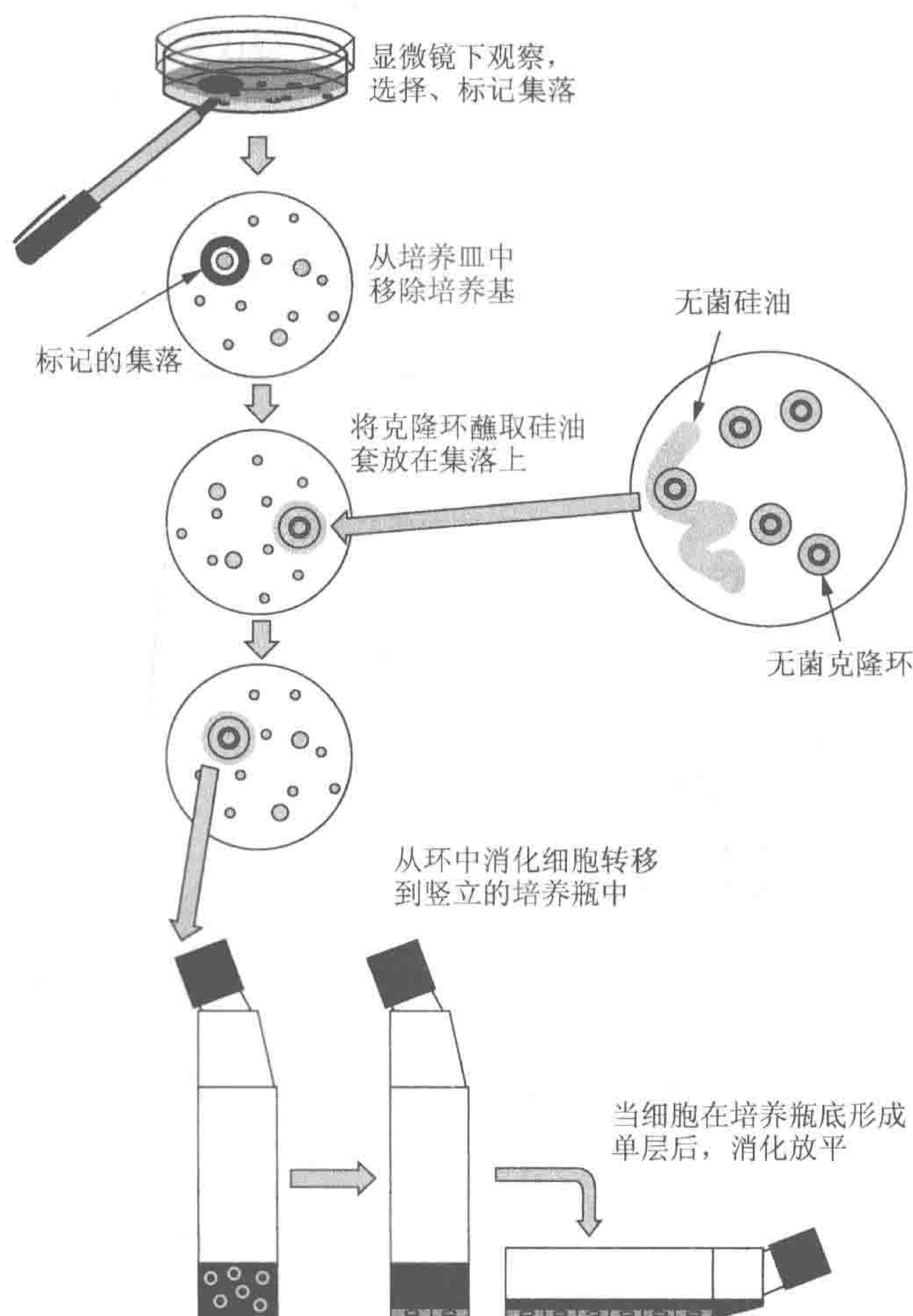


图 16.9　单层贴壁细胞克隆的分离培养。显微镜下观察成熟的集落，选择并标记合适当集落。移去培养基，将克隆环蘸取硅油后套放在每个集落上，在环内用胰蛋白酶消化

材料

无菌

- 克隆培养环（Fisher Scientific or Bellco；另见补充材料中的附录III），放在培养皿中干热或高温高压灭菌
- 硅油，于玻璃培养皿中 160℃干热灭菌 1h，或 121℃高压灭菌 15min。
- 黄色枪头或弯头吸管和带钝头的巴氏吸管（EMS）

- D-PBSA配制的0.25%胰蛋白酶
- 生长培养基
- 多孔板、24孔板和（或）$25cm^2$培养瓶
- 无菌镊

非无菌

- 加样枪，50~100μL
- 毡制粗头笔或者最好用Nikon物镜标记笔（Nikon or SEO公司），或用可插入显微镜物镜转换盘的物镜标记笔，其可替代一个物镜。

操作步骤

1. 观察细胞克隆，用毡制粗头笔或Nikon标记笔在培养皿底面对要分离的集落做标记。
2. 撤去培养基，用D-PBSA轻轻冲洗细胞克隆。
3. 用无菌镊夹取一个克隆培养环，蘸取硅油，硅油面冲下，压放在培养皿上，使硅油均匀分布在克隆培养环底面。
4. 将环圈套于所需集落上。
5. 在同一培养皿重复步骤4、5，圈套2~3个其他所需集落。
6. 加足量的0.25%胰蛋白酶充满环内（0.1~0.4mL，取决于环内径的大小）。
7. 保留20s后弃去。
8. 盖上培养皿，37℃条件下孵育15min。
9. 每个环中加0.1~0.4mL的培养基。
10. 依次对每个克隆用吸管吹吸分散细胞，并将细胞悬液分别移入24孔板的一个孔或竖直放置的$25cm^2$培养瓶内，每个细胞克隆都分别使用独自的吸管或枪头。
11. 用0.1~0.4mL的培养基冲洗克隆环，再将这些培养基分别移入相应的培养孔或培养瓶中。

注意事项 培养皿暴露过长时间会变干，所以要限制分离的克隆数量或在每步操作之间盖上培养皿。

12. 将培养孔中的培养基加至1mL，盖好，继续培养。如果用的是培养瓶，就在每个瓶中加1mL的培养基，竖直放置培养。
13. 当克隆细胞长满培养孔时，移至$25cm^2$培养瓶内，加5mL培养基，常规培养。如果采用的是直立培养瓶法（图16.9），当瓶底长满细胞后，撤去培养基，胰蛋白酶消化，加5mL培养基，平放培养瓶继续培养。

16.4.1 单层贴壁细胞克隆的其他分离技术

（1）有一种培养瓶的顶是可以打开的薄膜（TTP）。将薄膜移去就可以收集细胞克隆。

（2）在培养皿底部分散放些小盖玻片或盖玻片的碎片，种上恰当密度的细胞，一些集落就会单个地分散于一块块玻片上，这时可以将它们移至新的培养皿或多孔板中。

（3）利用Sanford等（1948）的毛细管技术，将稀释的细胞悬液吸入一个无菌的玻璃毛细管中（如50μL Drummond微细管），集落会在管内形成。然后在集落的任意一边缘小心折断毛细管，将集落移至新的培养板中。Echarti和Maurer（1989，1991）将这一技术用于造血细胞和肿瘤细

胞的克隆起源分析，同时通过密度仪观察毛细管可以得出集落形成率。

（4）细胞克隆化可用 Opticell 小室进行，该小室有两个背靠背的薄薄的有柔韧性的塑料细胞生长表面，可用手术刀切或剪刀剪。只要外表面保持无菌，可切出带有克隆的部分，胰蛋白酶消化后，移入多孔板或培养瓶中。

（5）每个瓶中，遮挡住一个细胞克隆，用射线照射培养瓶，可以分离这个克隆（参见方案 16.7）。

16.4.2 悬浮细胞克隆

分离悬浮培养形成的集落简单易行，但需要解剖显微镜。

方案 16.7 悬浮细胞克隆的分离

概要

用加样枪或 Pasteur 吸管吸取集落，移至培养瓶或多孔板的培养孔中（图 16.10）。

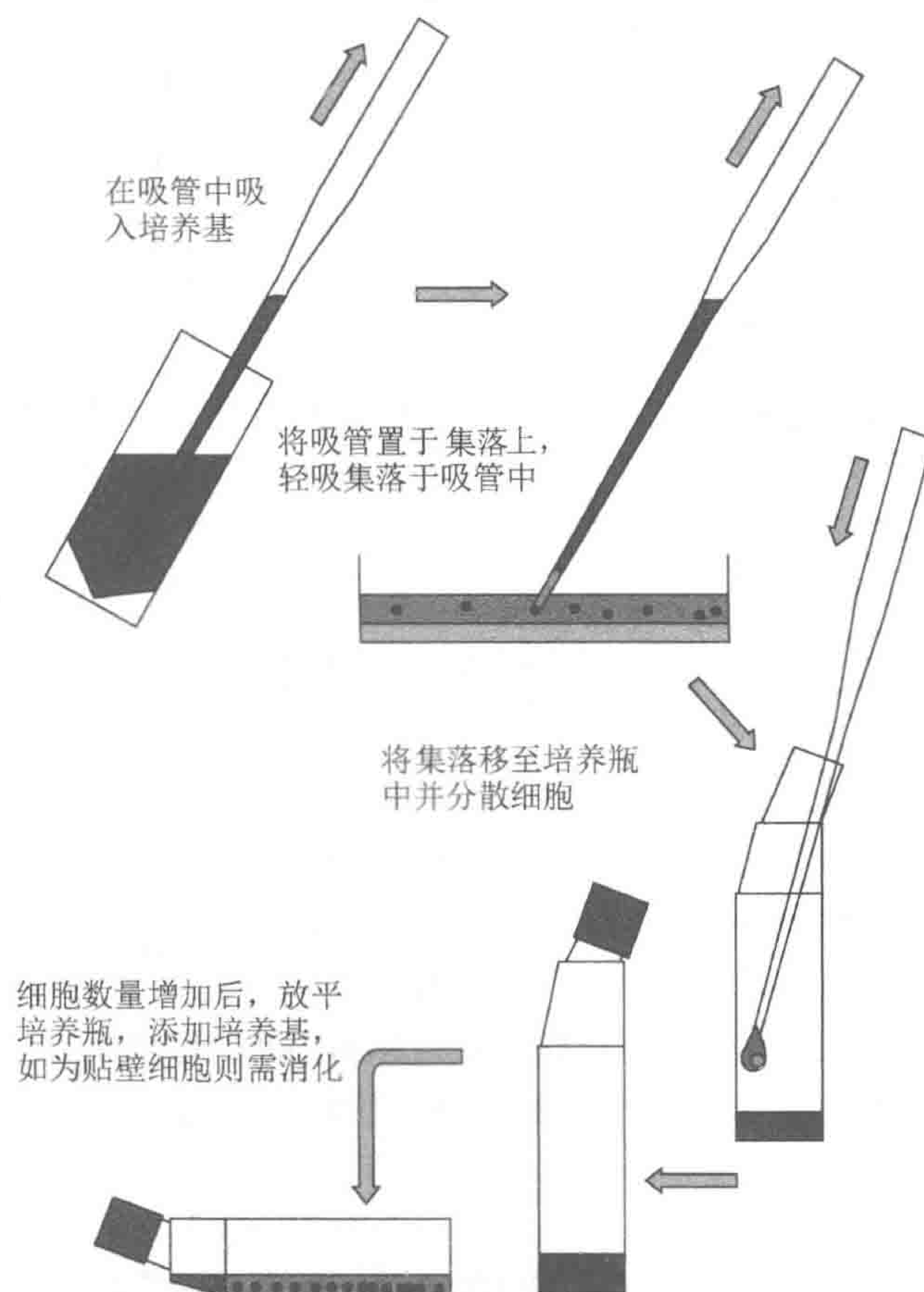


图 16.10 悬浮细胞克隆的分离培养。与单层贴壁细胞克隆一样，标记集落，将集落吸入吸管或移液吸头，移至培养瓶中，在培养基中分散细胞，进行培养。细胞开始生长时，补足培养基

材料

无菌

- 生长培养基
- 多孔板，24孔
- 培养瓶，25cm^2
- 带过滤的黄色加样枪头或塞棉花的吸管

非无菌

- 解剖显微镜，（20~50）×放大
- 加样枪，100μL
- 毡制粗头笔或Nikon物镜标记笔

操作步骤

1. 用倒置显微镜观察培养皿中的细胞，用毡制粗头笔或Nikon标记笔标记出集落。
2. 24孔板的每一孔中加1mL培养基。
3. 解剖显微镜下挑取集落。
4. 每一个细胞集落用一个枪头。
5. 将加样枪调至100μL。
6. 先用枪头吸大约50μL的培养基，将该枪头对准要分离的集落，在集落内轻轻吸取剩余的50μL。
7. 将吸取物移至24孔板，用培养基冲洗集落，如果培养基中含美希索，集落就会沉下去，如果是贴壁细胞，细胞会黏附，然后向外生长；悬浮生长的细胞会安顿下来，当然不贴壁。如果培养基含有琼脂，则需用吸管在培养孔内上下吹吸集落几次，分散琼脂。细胞克隆也可以直接移至竖直放置的25cm^{2}的塑料培养瓶中（参见方案16.6）。

16.5 复制性培养

细菌集落可以复制培养，用一块湿片轻轻地按压在营养琼脂培养皿中的细菌集落上，再将这块湿片转移至另一个新鲜琼脂培养皿上。人们通过各种尝试将这种技术应用于细胞培养。通常将一个筛网或滤膜放在单层贴壁细胞克隆上，几天后将其移至新的培养皿中（Hornsby et al.，1992）。对于在微量滴定板中形成的细胞克隆，有很多可供选择的转移用具，包括Corning Transtar（参见图4.8）或微孔板复制器（Microplate Replicator, Bio-World），可以直接用于经振荡后充分悬浮的细胞或消化后悬浮的单层贴壁细胞。有些微孔板自动化系统有孔板复制装置（参见21.5.1节）。

16.6 选择性培养基和抑制剂

利用选择性培养基控制培养条件是一种筛选微生物的标准方法，但这种方法应用于培养的动

物细胞有局限，因为从动物体分离下来的大多数细胞具有相似的基础新陈代谢，也就是相似的营养需求；血清的作用使问题加剧，血清会掩盖不同培养基的选择特性。大多数已证明成功的选择性培养基是无血清配方（参见 9.2 节）。这是选择性原代培养及特殊类型细胞早代数培养最成功的方法。这类培养基多数有商业供应（参见表 25.1），通常与原代或传代的选择培养的细胞同时提供（参见 25.1 节）。

多种代谢抑制剂不断被研制成功。这些抑制剂的主要目的是抑制成纤维细胞的过度生长，其过度生长不但主宰而且会抑制培养物中其他细胞的生长（Halaban，2004）。Gilbert 和 Migeon（1975，1977）用右旋缬氨酸代替培养基中的左旋缬氨酸，并证实只有含右旋缬氨酸氧化酶的细胞才能在这种培养基中很好地生长。通过这种方法筛选出了肾小管上皮细胞（Gross et al.，1992）、牛乳腺上皮细胞（Sordillo et al.，1988）、大鼠脑内皮细胞（Abbott et al.，1992）和施万细胞（Armati and Bonner，1990；Kaewkhaw et al.，2012）。但这种方法对人成纤维细胞无效（Masson et al.，1993）。Kao 和 Prokop（1977）用顺式羟-脯氨酸抑制成纤维细胞的过度生长，但证明对其他细胞也有毒性。Fry 和 Bridges（1979）发现苯巴比妥可以抑制肝细胞培养中成纤维细胞的过度生长。卡马西平也可抑制成纤维细胞生长（Parada-Turska et al.，2013）。Braaten 等（1974）也用乙基硫代水杨酸汞钠（硫柳汞，ethylmercurithiosalicylate）处理，减少了新生儿胰腺原代培养中的成纤维细胞污染，之后又经成年大鼠胰腺培养确认（Kaiser et al.，1988）。成纤维细胞还对 100μg/mL 的 G418 比较敏感（Halaban and Alfano，1984；Levin et al.，1995）。

更为有效的方法之一是针对人乳腺癌基质细胞的单克隆抗体的开发（Edwards et al.，1980）。这种抗体与补体一起用，对几种肿瘤的成纤维细胞有细胞毒性，并且帮助纯化了多种恶性细胞系。此外，人们还尝试在抗体上连接药物或毒物来选择杀伤细胞（如 Beattie et al.，1990）。然而选择性抗体在盘化和磁珠分离技术上应用更广泛（参见 17.3.1 节）。

选择性培养基也常用于体细胞杂交实验中分离杂交的细胞克隆。HAT 培养基是次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷嘧啶脱氧核苷 3 种物质的混合培养基（参见附录 I），用于将同时具有腺嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和胸苷激酶的杂交细胞从缺乏两个酶中任何一种的亲代细胞中筛选出来（Littlefield，1964a），此法现在仍用于杂交瘤的选择（如 Malaki et al.，2014；Richardson et al.，2012）（另见 25.6 节，方案 25.24-Su）。

转染的细胞可以通过对一些药物的抗性来进行筛选，如新霉素及其类似物 G418、潮霉素和氨甲蝶呤，只要在细胞转染的序列中加入可以赋予细胞耐药性的基因［如 *neo*（氨基糖苷磷酸转移酶基因）、*hph*（潮霉素 B 磷酸转移酶基因）、*dhfr*（二氢叶酸还原酶基因）；参见 16.6 节］。向培养物中加入适当浓度的选择性药物就可以筛选出稳定转染的细胞，选择性药物的浓度是根据转染与未转染对照的滴定实验确定的。氨甲蝶呤作为筛选标记还具有特别的优势，增大氨甲蝶呤的浓度可以使 *dbfr* 基因扩增，还可以协同扩增转染序列中其他基因。

在本章附加材料中，有制作氨甲蝶呤抗性细胞系的实验方案 16.9-Su。

单纯疱疹病毒（HSV）*TK* 基因也可用于阴性筛选。这种基因能使 Ganciclovir（Roche 公司生产）活化为一种细胞毒产物（Jin et al.，2003）。转染后的细胞会对这种药物敏感。

如果混合在一起的几种细胞对生长因子表现出不同反应，可以用一种合适的生长因子刺

激某一类型的细胞生长。利用生长较快的细胞对射线照射或阿糖胞苷（ara-c）处理敏感性增加的特性，可以选择性杀灭这种细胞（参见25.4.1节）。反之，如果加入一种已知的抑制剂或撤去一种生长因子使某种细胞退出细胞周期，再用ara-c或射线照射就可以杀灭那些依然处于周期中的细胞。

16.7 细胞与基质的相互作用

16.7.1 选择性黏附

不同类型的细胞对培养基质有不同的亲和力和不同的黏附速度。如果将原代细胞悬液种在培养瓶中，30min后移入另一个培养瓶，1h后移到第三个培养瓶，依此类推，24h后就会发现黏附性最强的细胞在第一个培养瓶中，黏附性最弱的细胞在最后一个培养瓶中。巨噬细胞会留在第一个培养瓶内，成纤维细胞在接下来的几个培养瓶中，上皮细胞又在接着的几个培养瓶中，造血细胞在最后的培养瓶中。类似的方法已经用于从人类软骨组织中分离软骨祖细胞（Archer et al.，2007）。

如果胶原酶加在完全培养基中用于原代组织块细胞的解离（参见方案11.9），绝大部分消化下来的细胞在不撤去胶原酶的情况下48h内不会贴壁，而巨噬细胞迁移出组织块后在这段时间内就会贴壁。因此，将加入胶原酶48~72h后消化下来的其他细胞移至新的培养瓶，就可以除去巨噬细胞。这种方法应用在人肿瘤活检标本细胞的分离上很好。

16.7.2 选择性脱壁

用胰蛋白酶或者胶原酶消化有异质性的单层贴壁细胞，有一些细胞会比其他细胞更快地脱壁。根据这种差别，短时重复使用胰蛋白酶消化可以将成纤维细胞从人胎儿肠道细胞（Owens et al.，1974）和皮肤细胞（Milo et al.，1980）中分离除去。Lasfargues（1973）发现用胶原酶处理的乳腺组织，几天后可以一次性除去成纤维细胞，保留上皮细胞；相反，EDTA释放上皮细胞的能力强于释放成纤维细胞的能力（Paul，1975）。

在不动饲养层细胞3T3的情况下，Dispase Ⅱ（Roche）可以选择性地从3T3饲养层上消化分离出人子宫颈上皮细胞（参见方案25.30-Su）。这种方法将可有效用于从其他细胞包括基质成纤维细胞中分离培养上皮细胞。

16.7.3 基质性质

尽管有几种细胞外基质（ECM）可供利用（参见附加材料中的附录Ⅲ），到目前为止，重点落在促进细胞的生存或分化，在人们“设计”的基质中，很少考虑到它们的筛选性潜质。当然，有报道说胶原能促进上皮细胞的增殖（Kibbey et al.，1992；Kinsella et al.，1992）；Matrigel也有利于上皮细胞的生长和分化（Bissell et al.，1987；Ghost et al.，1991；Kibbey et al.，1992）。由于各种基质的组成目前比较清楚，我们可以选用各种类型的胶原与黏蛋白、层粘连蛋白和其他基质蛋白混合制成更具有细胞选择性的基质。培养基质的选择性作用可能有赖于细胞的不同附着率和生长率，或是二者的综合作用。胶原和层粘连蛋白包被，用来促进上皮细胞的黏附和生长

（Lechner and LaVeck，1985；Wise，2002）（参见方案25.5-Su、方案25.9-Su），支持上皮细胞生长和发挥功能（Relou et al.，1998；Martin et al.，2004）。

16.7.4 选择性饲养层

同条件基质一样，饲养层（参见16.2.3节）也能用于上皮细胞的选择性生长（Rheinwa and Green，1975）（参见25.2.1节、25.2.4节、25.13.2节），还用于抑制乳腺癌（图25.10，彩版6c、d）和结肠癌（参见方案25.30-Su）（Freshney et al.，1982b）培养中基质细胞的过度生长。饲养层的作用可能十分复杂，它不仅为上皮细胞的黏附提供细胞外基质，还提供活化发挥作用的生长因子和灭活TGF-β负调节子（Mass-Szabowski and Fusenig，1996）。人神经胶质瘤细胞可以生长在由正常神经胶质细胞构成的饲养层上，而正常脑组织细胞则不能（MacDonald et al.，1985）（参见方案25.28）。



彩版6

16.7.5 半固体培养基选择

很多成纤维细胞经转化后会降低增殖的停泊依赖性（Macpherson and Montagnier，1964）（参见22.4.1节）。用琼脂培养基培养经病毒转化的细胞（参见方案16.4），可分离出转化细胞的集落，除去大部分正常的细胞。虽然正常细胞也有很低的克隆形成率，但和具有高克隆形成率的转化细胞一同悬浮培养，不会形成集落。病毒转化与未经转化的成纤维细胞的差别，不如与早代培养的肿瘤间的差别清楚，因其克隆形成率非常低。正常神经胶质细胞和胎儿皮肤成纤维细胞悬浮培养时也形成集落，效率类似（<1%）（图16.11）。

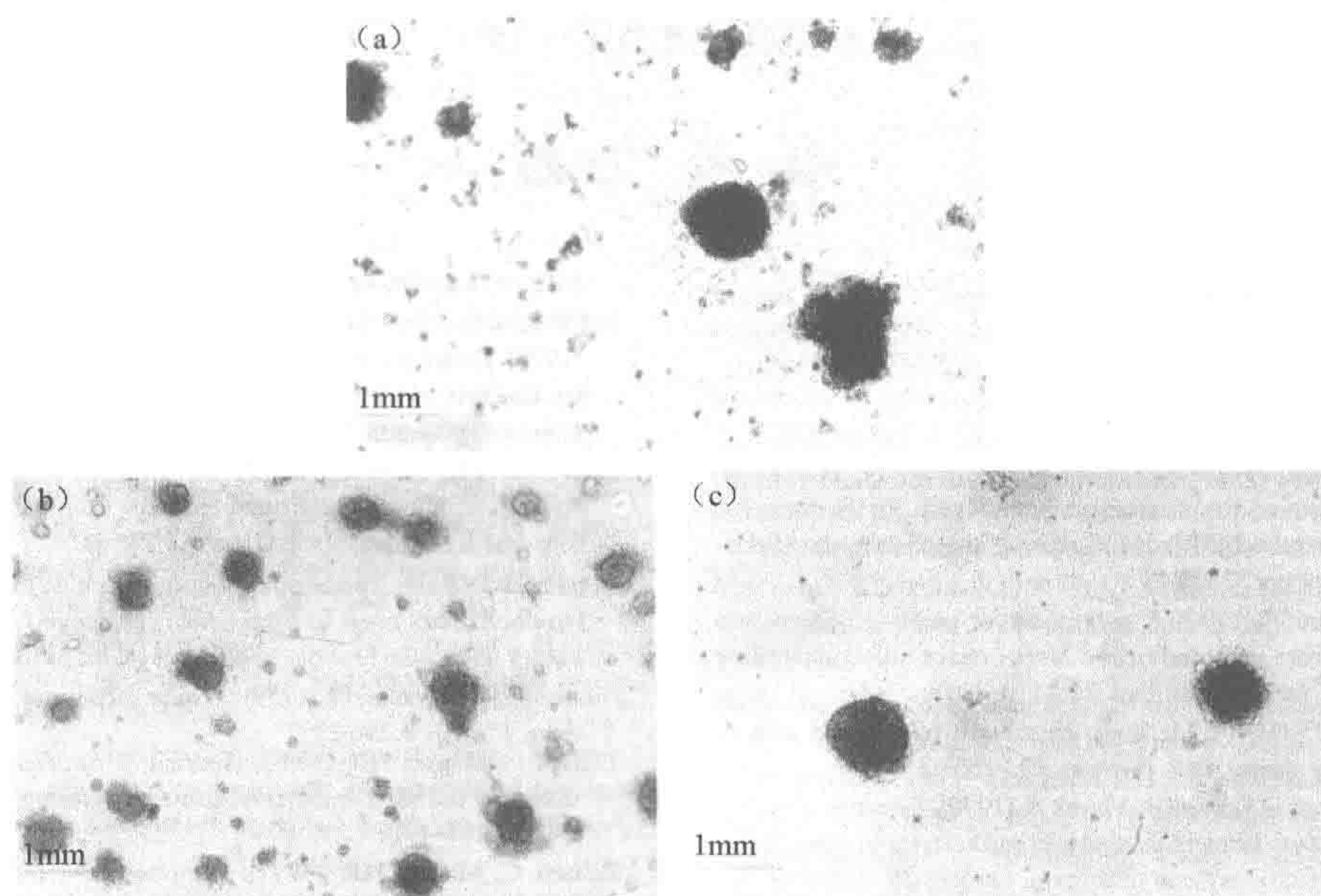


图16.11 黑色素瘤、成纤维细胞和胶质瘤细胞的悬浮生长。细胞在1.5%的美希索中以每个35mm平皿5×10^5个细胞（2.5×10^5个/mL）接种到1.25%的琼脂底层上。3周后进行集落照相。（a）黑色素瘤；（b）正常人胚胎皮肤成纤维细胞；（c）正常成人胶质细胞

细胞克隆培养和选择性培养条件比物理法细胞分离技术有很大优越性（参见第17章）。因为克隆培养筛选可以彻底除去混杂的细胞，持续或重复地应用选择性条件可以抑制混杂的细胞生长。而即使采用最先进的物理方法，仍然会有一些细胞群体之间的重叠，导致混杂的细胞再次过度生长，难以获得稳定状态，培养物的构成也会不断改变。细胞系A原来占90%，由于混入的细胞系B生长快，10天后，培养瓶中A、B细胞就各占50%了（图16.12）。因此，连续培养细胞时应该附加选择性条件培养或直接用选择性条件培养取代物理分离方法。

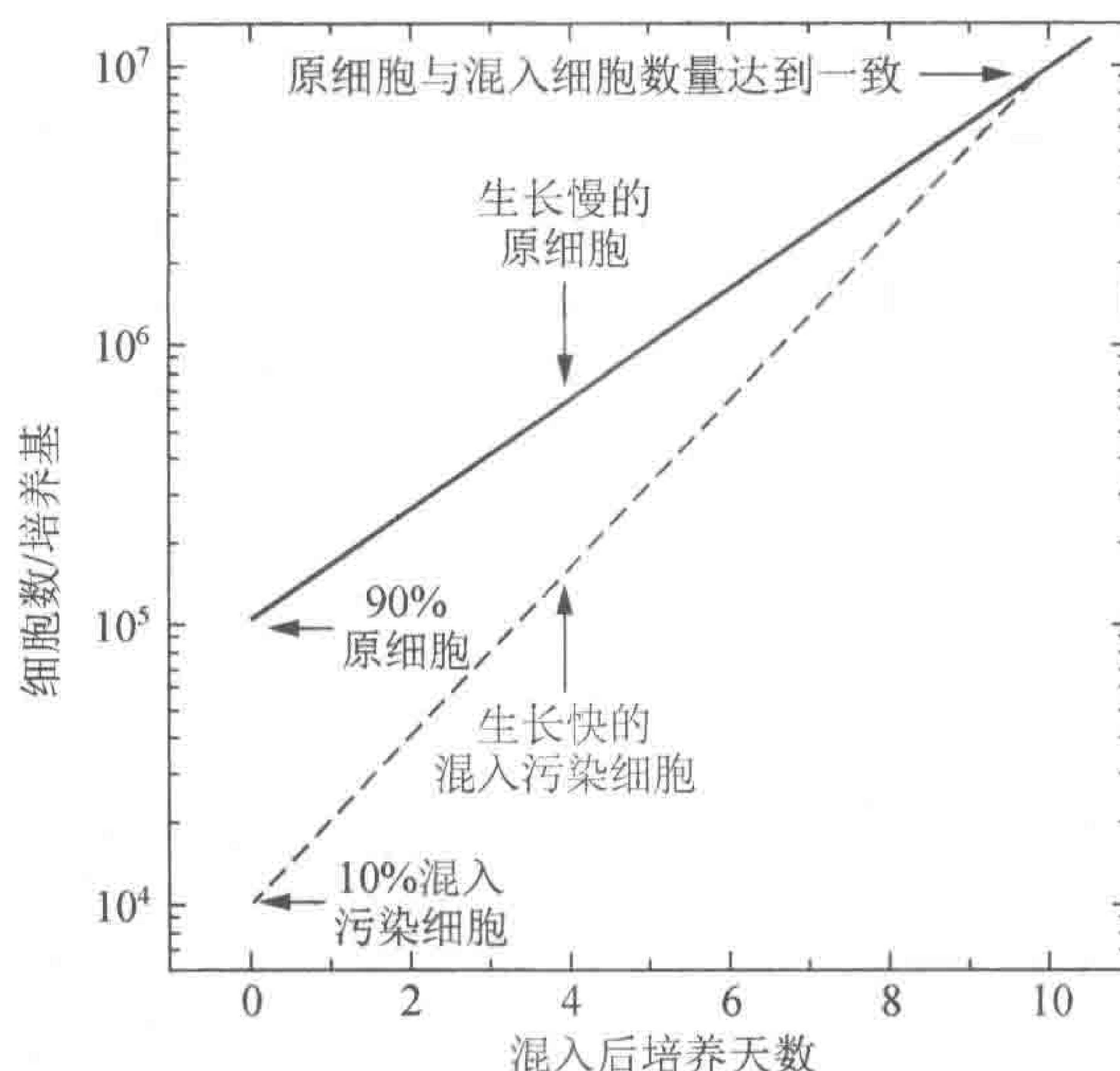


图16.12 混杂培养物中过度生长。 快速生长的污染细胞超过生长慢的细胞系。这张图描绘了一个假设的例子：显示一个细胞系中有10%的污染细胞，污染细胞的倍增时间是24h，该细胞系的倍增时间是36h，仅10天后，两种细胞的比例将相同

参考文献

Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: Towards an *in vitro* blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* **103**(Part 1):23–37.

Archer CW, Oldfield S, Redman S, Haughton L, Dowthwaite G, Khan I, Ralphs J (2007). Isolation, characterization, and culture of soft connective tissue stem/progenitor cells. In FreshneyRI, StaceyGN, AuerbachJM (eds.), *Culture of human stem cells.* Hoboken, NJ: Wiley, pp. 233–248.

Armati PJ, Bonner J (1990). A technique for promoting Schwann cell growth from fresh and frozen biopsy nerve utilizing d-valine medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:1116–1118.

Barnes D, Sato G (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **102**:255–270.

Beattie GM, Lappi DA, Baird A, Hayek A (1990). Selective elimination of fibroblasts from pancreatic islet monolayers by basic fibroblast growth factor-saporin mitotoxin. *Diabetes* **39**:1002–1005.

Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel: Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal liver. *J. Clin. Invest.* **79**:801–812.

Braaten JT, Lee MJ, Schewk A, Mintz DH (1974). Removal of fibroblastoid cells from primary monolayer cultures of rat neonatal endocrine pancreas by sodium ethylmercurithiosalicylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**:476–482.

Buick RN, Stanisic TH, Fry SE, Salmon SE, Trent JM, Krosovich P (1979). Development of an agar-methyl cellulose clonogenic assay for cells of transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer Res.* **39**:5051–5056.

Courtenay VD, Selby PI, Smith IE, Mills J, Peckham MJ (1978). Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. *Br. J. Cancer* **38**:77–81.

Drexler HG (2004). Establishment and culture of human leukemia-lymphoma cell lines. In PfragnerR, FreshneyRI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 319–348.

Dulbecco R, Freeman G (1959). Plaque formation by the polyoma virus. *Virology* **8**:396–397.

Echarti C, Maurer HR (1989). Defined, serum-free culture conditions for the GM-microclonogenic assay using agar-capillaries. *Blut* **59**:171–176.

Echarti C, Maurer HR (1991). Lymphokine-activated killer cells: Determination of their tumor cytolytic capacity by a clonogenic microassay using agar capillaries. *J. Immunol. Methods* **143**:41–47.

Edwards PAW, Easty DM, Foster CS (1980). Selective culture of epithelioid cells from a human squamous carcinoma using a monoclonal antibody to kill fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **4**:917–922.

Freshney RI, Hart E, Russell JM (1982). Isolation and purification of cell cultures from human tumours. In ReidE, CookGMW,

MooreDJ (eds.), *Cancer cell organelles;Methodological surveys (B): Biochemistry*,Vol. **2**. Chicester, UK: Horwood, pp. 97–110.

Freshney RI, Morgan D, Hassanzadah M, Shaw R, Frame M (1980a). Glucocorticoids, proliferation and the cell surface. In RichardsRJ, RajanKT (eds.), *Tissue culture in medical research (II)*. Oxford, UK: Pergamon Press, pp. 125–132.

Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D (1980b). Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. *Br. J. Cancer* **41**:857–866.

Fry J, Bridges JW (1979). The effect of phenobarbitone on adult rat liver cells and primary cell lines. *Toxicol. Lett.* **4**:295–301.

Ghosh, D., Danielson, K. C., Alston, J. T., & Heyner, S. (1991). Functional differential of mouse uterine epithelial cells grown on collagen gels or reconstituted basement membranes. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27A**:713–719.

Gilbert SF, Migeon BR (1975). d-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* **5**:11–17.

Gilbert SF, Migeon BR (1977). Renal enzymes in kidney cells selected by d-valine medium. *J. Cell Physiol.* **92**:161–168.

Griffiths JB, Pirt GJ (1967). The uptake of amino acids by mouse cells (Strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: The influence of cell growth rate. *Proc. Roy. Soc. Biol.* **168**:421–438.

Gross SK, Lyerla TA, Williams MA, McCluer RH (1992). The accumulation and metabolism of glycosphingolipids in primary kidney cell cultures from beige mice. *Mol. Cell Biochem.* **118**:61–66.

Halaban R (2004). Culture of melanocytes from normal, benign, and malignant lesions. In PfragnerR, FreshneyRI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 289–318.

Halaban R, Alfano FD (1984). Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes. *In Vitro* **20**:447–450.

Ham RG (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell Res.* **29**:515.

Ham RG (1984). Growth of human fibroblasts in serum-free media.InBarnesDW, SirbaskuDA, SatoGH (eds.), *Cell culture methods for molecular and cell biology*, Vol. **3**. New York: Alan R. Liss, pp. 249–264.

Hamilton WG, Ham RG (1977). Clonal growth of Chinese hamster cell lines in protein-free media. *In Vitro* **13**:537–547.

Hashimoto N (2004). Stem cell systems in skeletal muscle. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**:741–748.

Hornsby PJ, Yang L, Lala DS, Cheng CY, Salmons B (1992). A modified procedure for replica plating of mammalian cells allowing selection of clones based on gene expression. *Biotechniques* **12**:244–251.

Iscove NN, Guilbert LW, Weyman C (1980). Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp. Cell Res.* **126**:121–126.

Jin DI, Lee SH, Choi JH, Lee JS, Lee JE, Park KW, Seo JS (2003). Targeting efficiency of a-1,3-galactosyl transferase gene in pig fetal fibroblast cells. *Exp. Mol. Med.* **35**:572–577.

Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW (2012). Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue. *Nat. Protoc.* **7**:1996–2004.

Kaiser N, Corcos AP, Tur-Sinai A, Ariav Y, Cerasi E (1988). Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: Long term maintenance of differentiated B-cell function. *Endocrinology* **123**:834–840.

Kao W-Y, Prockop DI (1977). Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations. *Nature* **266**:63–64.

Kibbey MC, Royce LS, Dym M, Baum BJ, Kleinman HK (1992). Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumour cell line A253 on basement membrane components. *Exp. Cell Res.* **198**:343–351.

Kinsella JL, Grant DS, Weeks BS, Kleinman HK (1992). Protein kinase C regulates endothelial cell tube formation on basement membrane matrix, Matrigel. *Exp. Cell Res.* **199**:56–62.

Lasfargues EY (1973). Human mammary tumors. In KruseP, PattersonMK (eds.), *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press, pp. 45–50.

Lechner JF, LaVeck MA (1985). A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods* **9**:43–48.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* **141**:872–883.

Levin DB, Wilson K, Valadares de Amorim G, Webber J, Kenny P, Kusser W (1995). Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi. *Cancer Res.* **55**:4278–4282.

Littlefield JW (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* **145**:709–710.

Lowe KC, Davey MR, Power JB (1998). Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol.* **16**:272–277.

Maas-Szabowski N, Fusenig NE (1996). Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **107**:849–855.

MacDonald CM, Freshney RI, Hart E, Graham DI (1985). Selective control of human glioma cell proliferation by specific cell interaction. *Exp. Cell Biol.* **53**:130–137.

Macpherson I, Bryden A (1971). Mitomycin C treated cells as feeders. *Exp. Cell Res.* **69**:240–241.

Macpherson I, Montagnier L (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**:291–294.

Maleki LA, Majidi J, Baradaran B, Movassaghpour A, Abdolalizadeh J (2014). Generation and characterization of anti-CD34 monoclonal antibodies reactive with hematopoietic stem cells. *Cell J.* **16**(3).

Martin SM, Schwartz JL, Giachelli CM, Ratner BD (2004). Enhancing the biological activity of immobilized osteopontin using a type-1 collagen affinity coating. *J. Biomed. Mater. Res.* **70A**:10–19.

Masson EA, Atkin SL, White MC (1993). d-Valine selective medium does not inhibit human fibroblast growth in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **29A**:912–913.

McFarland DC, Liu X, Velleman SG, Zeng C, Coy CS, Pesall JE (2003). Variation in fibroblast growth factor response and heparan sulfate proteoglycan production in satellite cell populations. *Compar. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **134**:341–351.

McKeehan WL (1977). The effect of temperature during trypsin treatment on viability and multiplication potential of single normal human and chicken fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **1**:335–343.

McKeehan WL, Ham RG (1976). Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* **71**:727–734.

McKeehan WL, McKeehan KA (1979). Oxocarboxylic acids, pyridine nucleotide-linked oxidoreductases and serum factors in regulation of cell proliferation. *J. Cell Physiol.* **101**:9–16.

Milo GE, Ackerman GA, Noyes I (1980). Growth and ultrastructural characterization of proliferating human keratinocytes *in vitro* without added extrinsic factors. *In Vitro* **16**:20–30.

Muirhead EE, Rightsel WA, Pitcock JA, Inagami T (1990). Isolation and culture of juxtaglomerular and renomedullary interstitial cells. *Methods Enzymol.* **191**:152–167.

Owens RB, Smith HS, Hackett AJ (1974). Epithelial cell culture from normal glandular tissue of mice. Mouse epithelial cultures enriched by selective trypsinisation. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**:261–269.

Parada-Turska J1, Nowicka-Stążka P, Majdan M, Jabłoński M, Turski WA, Rzeski W (2013). Anti-epileptic drugs inhibit viability of synoviocytes in vitro. *Ann. Agric. Environ. Med.* **20**(3):571−574.

Paul J (1975). *Cell and tissue culture*. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 172–184.

Puck TT, Marcus PI (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**:432–437.

Relou IA, Damen CA, van der Schaft DW, Groenewegen G, Griffioen AW (1998). Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue Cell.* **30**:525−530.

Rheinwald JG., Green H (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**:331–344.

Richardson NC, Sargentini NJ, Singh VK, Stuart MK (2012). Monoclonal antibodies against the Escherichia coli DNA repair protein RadA/Sms. *Hybridoma* (Larchmont) **31**:25−31.

Sanford KK, Earle WR, Likely GD (1948). The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**:229.

Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM (1988). Culture of bovine mammary epithelial cells in d-valine modified medium: Selective removal of contaminating fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **12**:355–364.

Stanley MA (2002). Culture of human cervical epithelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 138−169.

Stanners CP, Eliceri GL, Green H (1971). Two types of ribosome in mouse to hamster hybrid cells. *Nat. New Biol.* **230**:52−54.

Suh H, Song MJ, Park YN (2003). Behavior of isolated rat oval cells in porous collagen scaffold. *Tissue Eng.* **9**:411−420.

Troyer DA, Kreisberg JI (1990). Isolation and study of glomerular cells. *Methods Enzymol.* **191**:141−152.

Walters MS, Gomi K, Ashbridge B, Moore MA, Arbelaez V, Heldrich J, Ding BS, Rafii S, Staudt MR, Crystal RG (2013). Generation of a human airway epithelium derived basal cell line with multipotent differentiation capacity. *Respir. Res.* **14**:135.

Wise C (2002). *Epithelial cell culture protocols*. Clifton, NJ: Humana Press.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, Ericson K, Terracio L, Asahara T, Masuda H, Tamura-Ninomiya S, Detmer K, Bray RA, Steele TA, Hixson D, el-Kalay M, Tobin BW, Russ RD, Horst MN, Floyd JA, Henson NL, Hawkins KC, Groom J, Parikh A, Blake L, Bland LJ, Thompson AJ, Kirincich A, Moreau C, Hudson J, Bowyer FP 3rd, Lin TJ, Black AC Jr (2004). Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell. Biochem. Biophys.* **40**:1−80.

Zeng C, Pesall JE, Gilkerson KK, McFarland DC (2002). The effect of hepatocyte growth factor on turkey satellite cell proliferation and differentiation. *Poultry Sci.* **81**:1191−1198.

Zwain IH, Morris PL, Cheng CY (1991). Identification of an inhibitory factor from a Sertoli clonal cell line (TM4) that modulates adult rat Leydig cell steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **80**:115−126.

（刘玉琴　译）

第17章

细胞分选

尽管克隆化培养及应用选择性培养条件是分离纯化培养细胞优先考虑的方法（参见9.2.2节、16.1节、16.6节），但也有遇到问题的时候：细胞因贴瓶效率不高而不能形成克隆，或者没有合适的选择性培养条件。这时只好求助于物理和免疫学分选技术。细胞分选技术虽然达不到克隆化培养所获得的细胞纯度，但由于其分离速度更快、分离量大，因而有其独特的优势。

比较成功的细胞分选技术依赖于以下几个方面的差别：①细胞密度（特有的比重）；②抗体对细胞表面抗原表位的亲和力；③细胞体积；④流式细胞仪利用光分散或荧光发射进行分选。前两种方法技术水平要求相对较低并且价廉，而后两种方法则要求较高的技术水平及昂贵的资金支出。最有效的分离常借助两个或多个参数，以便获得高纯度。

17.1 细胞密度及等密度沉降法

密度法分选细胞可以使用常规设备通过低速离心而实现，详见方案17.1。可以通过基质中的细胞分层将样品一步分离，或者像分离淋巴细胞一样，将去纤维蛋白或含肝素的血浆加在Ficoll和甲泛影酸上层，以1.077g/cm^{2}的速度离心从而分离其中的血细胞（另见方法25.22-Su），再或者将活细胞和死细胞分离（参见方法11.11）。因此，通过多步骤的细胞分层或者连续地以1.02~1.10g/cm^{2}的速度梯度离心可以完成更加复杂的分离（Pretlow and Pretlow，1989；Recktenwald，1997；Calder et al.，2004；Li et al.，2014）。离心后细胞沉降于密度梯度液中与自身密度相同的密度平衡点（等密度沉降）（图17.1）。沉降介质应当是无毒的，浓度高（1.10g/mL）时也不黏稠，而且在溶液中只产生极小的渗透压。Ficoll（GE Life Sciences）（Sykes et al.，1970），甲泛影酰胺（Santa Cruz）（Munthe-Kaas and Seglen，1974；Weiskirchen and Gressner，2005）及Percoll（GE Life Sciences）（Pertoft and Laurent，1982；Pramod and Mitra，2014）都曾被成功地用作沉降介质。可以通过3种方法制作密度梯度：①用吸管、注射器和泵把不同密度的Percoll一层一层叠加；②用特制的梯度形成仪（图17.2d）；③高速离心（图17.3）。

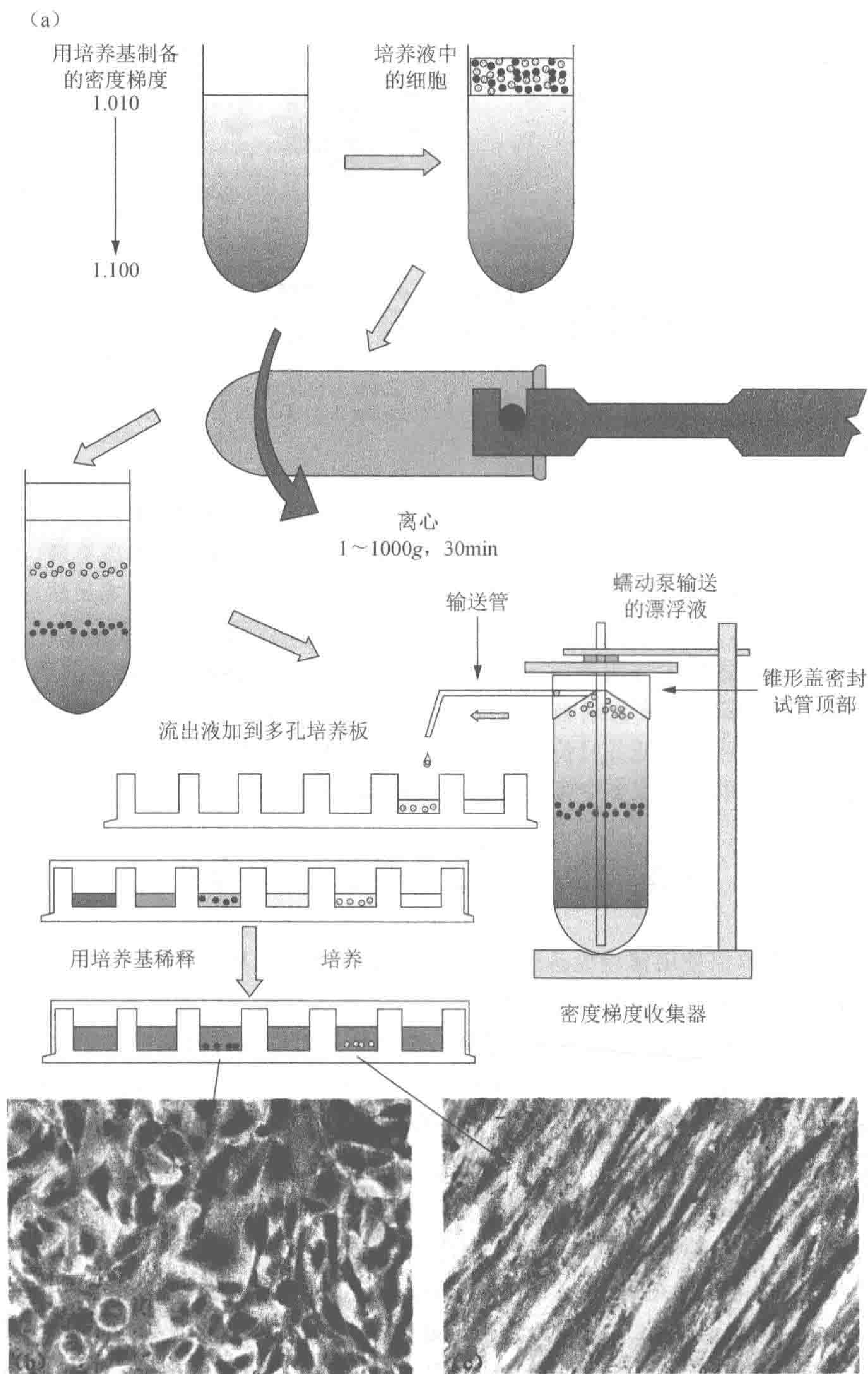


图 17.1　密度梯度法分离细胞。（a）细胞层放在预先形成的梯度上（图 17.2），然后离心。该离心管置于梯度收集器上，漂浮培养基（如 Fluorochemical FC43）通过进口泵入梯度底部，取代梯度液的位置，梯度液和细胞向上移动并流出，通过输送管导入多孔培养板，以培养基稀释细胞（以便它们沉降）进行培养；（b）从人为混合的 HeLa 细胞和 MRC-5 成纤维细胞中纯化出的 HeLa 细胞；（c）由较低密度层洗脱出的纯化 MRC-5 细胞（梯度混合器仿照 G. D. Birnie 博士的原始设计）

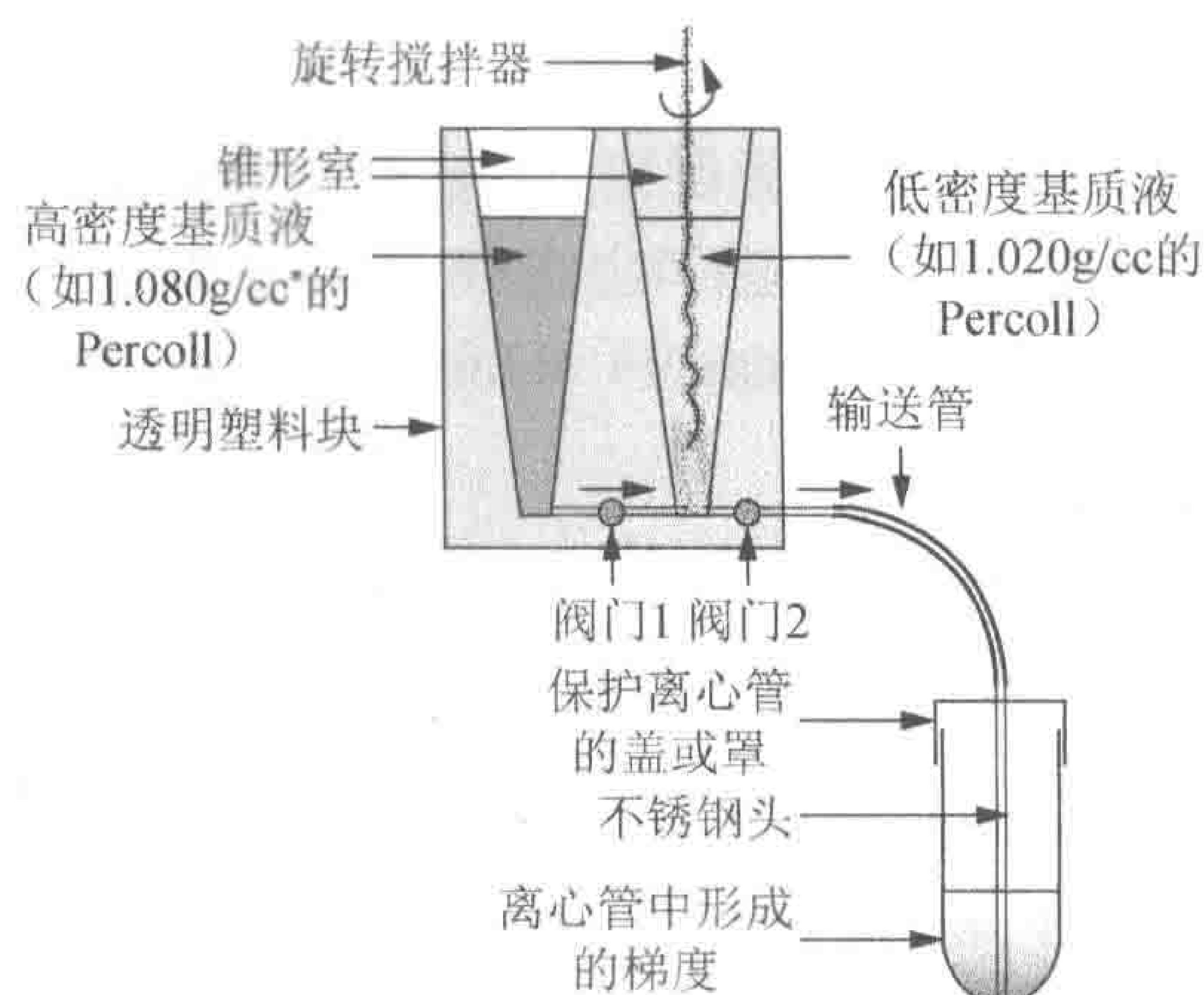


图 17.2 密度梯度形成器。透明塑料块中挖两个室，底部以细管相通并有出口到外面。带不锈钢头的输送管，长度可及离心管底部，插入出口。关闭两个阀门，左侧室装入高密度基质，右侧室装低密度基质。打开阀门 1，将不锈钢头置于离心管底部，打开搅拌器，然后开阀门 2。随着左侧室中的溶液进入右侧室，二者混合，混合物流出到离心管的同时密度不断增加

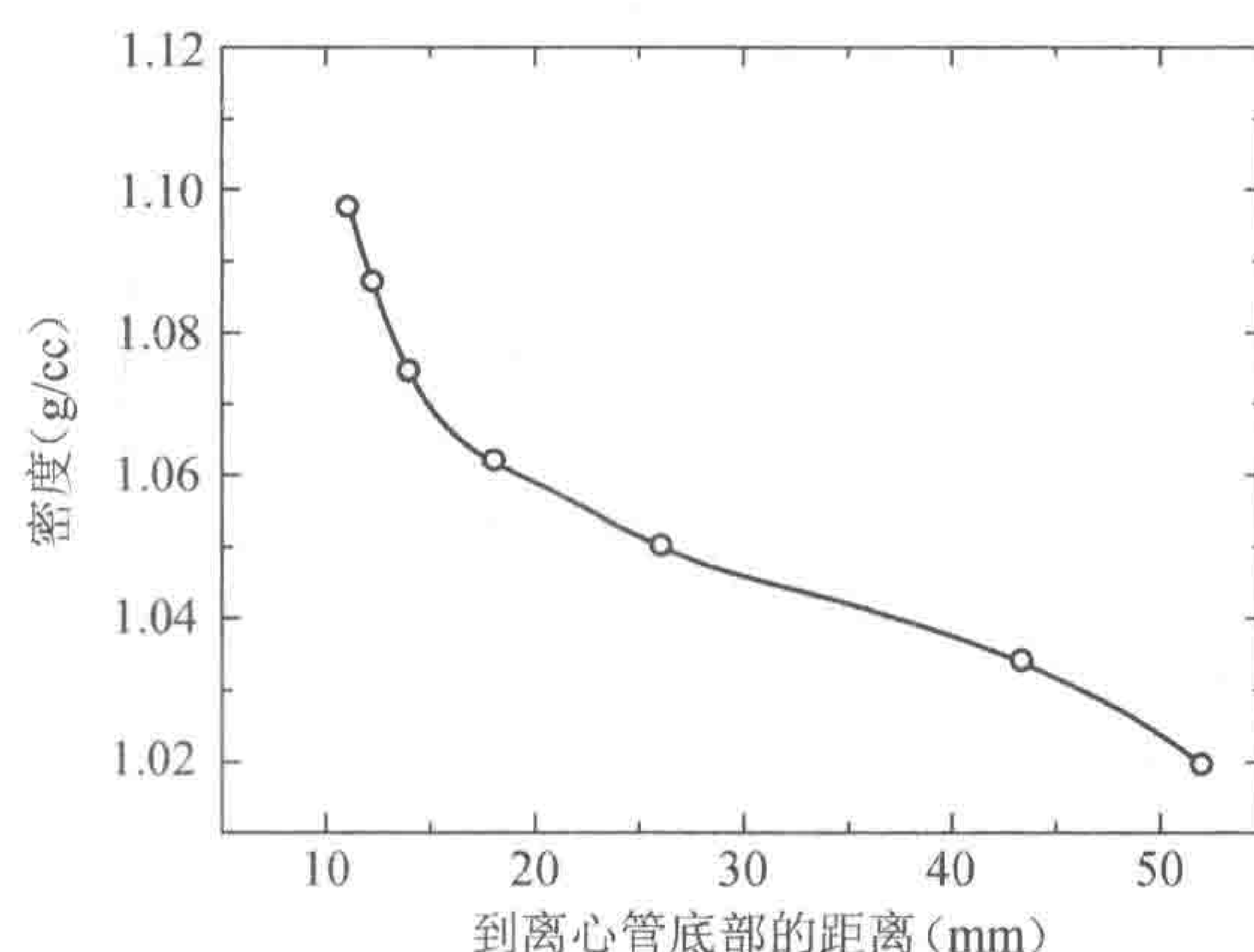


图 17.3 离心产生的梯度。以 20 000*g* 离心 Percoll 1h 产生的梯度

方案 17.1 密度梯度离心细胞分离法

概要

制备密度梯度液，通过密度梯度液离心细胞，收集各梯度部分，用培养基稀释，培养细胞（图 17.1）。

材料

无菌

- 生长培养基

---

* 1cc=1cm^3，全书同。

- 生长培养基+20% Percoll（GE Life Sciences）
- 25mL 离心管
- D-PBSA
- 0.25%胰蛋白酶
- 氟化物 FC43（Sigma-Aldrich）
- 密度梯度形成器（图 17.2）（GE Life Sciences or VWR）
- 注射器或梯度收集器（Axi-Shiled or Brandel）
- 24 孔培养板或微滴定板

非无菌

- 折光仪或密度计（如 Mettler Toledo）
- 血细胞计数板或细胞计数器
- 低速离心机

操作步骤

1．制备密度梯度液

（a）分层铺放法

（i）调整 Percoll 密度至 1.10g/cc，渗透压为 290mOsmol/kg。

（ii）将 Percoll 与不同比例的常规培养基混合达到所需的密度范围（如 1.020~1.100g/cc），一般为 10 或 20 个级差。

（iii）在 25mL 离心管中，用吸管、注射器和蠕动泵，每个密度取 1mL 或 2mL，从最高密度起，逐层地将一种密度液铺放在另一层上，建立起一种阶梯性密度梯度。也可以从底层铺起，先铺最低密度层面，再用注射器或蠕动泵，将高一级密度的溶液注射进上一级的下面。

（iv）密度梯度液可以立即使用或放置过夜。

（b）使用梯度形成器

一种连续性的线性梯度可以在梯度形成器里通过混合不同浓度的 Percoll 而实现。例如，在梯度发生器里将 1.020g/cc Percoll 与 1.080g/cc 的 Percoll 混合形成梯度（图 17.2）。

（c）离心法

（i）在离心管中加入含密度为 1.085g/cc Percoll 的培养基。

（ii）20 000*g* 离心 1h。

（iii）离心产生一个“S”形的密度梯度（图 17.3），其形状是由 Percoll 的初始浓度、离心时间、离心力、离心管形状及离心方式所决定的。

2．胰蛋白酶消化细胞，重新悬浮于加了血清或胰蛋白酶抑制剂的培养基中，确保是单细胞悬液。

3．用一个注射器、移液管或末端纤细的吸管将含 2×10^7 个细胞的 2mL 细胞悬液小心平铺在梯度液的顶端。

4．离心管直立在台面上 4h，让细胞在 1*g* 的状态下自由沉降，或者在 100~1000*g* 离心 20min。如果用后一种方法，要在离心开始时逐渐地加大离心速度，并且在离心快要结束时不要人为制动。

5．用一个注射器或梯度收集器（图 17.1）收集细胞。1mL 的量可以收集到一个 24 孔培养板中，0.1mL 的量则收集于一个 96 孔微滴定板上。每间隔一定时间应当取样进行细胞计数及梯度液的密度测定。密度测定可以使用折光仪或密度计。

6．每孔加入等体积的培养基，混匀以保证细胞能接触孔的底部。培养 24~48h 后，更换培养基以除去 Percoll。

可变条件

*铺放细胞的位置。*细胞可在高速离心生成密度梯度的过程中掺入。虽然只需离心一次，但细胞在如此强大的离心力作用下会受到破坏。细胞也可能会吸收Percoll（Pertoft and Laurent，1982）、Isopaque（Splinter et al.，1978）和Metrizamide（Freshney，1976），所以最好把细胞铺放于预制梯度液的顶端。

*其他介质。*甲泛影酸（Isopaque, Hypaque, Renografin）是一种不透X线的碘化合物，常用于放射影像学及与Ficoll一起用于淋巴细胞的分离纯化（参见方案25.22-Su），还可单独或者与Ficoll一起用于建立密度梯度。同样，Ficoll也能高压灭菌，是最常用介质之一。高浓度时Ficoll较Percoll黏度稍大一些，可能会使某些细胞凝集。甲泛葡胺（Sigma-Aldrich）是甲泛影酸的一种非离子衍生物，高浓度时甲泛葡胺较Ficoll黏性低（Richwood and Brinie, 1975），但可能会被细胞吸收（参见前述）。

*标记珠。*密度标记珠（Cospheric）是不同标准密度的彩色标记珠，可以用于指示梯度液中不同部位的密度。

在单位重力加速度作用下，等密度沉降法比速率沉降法要快（参见17.2.1节）；而且当梯度液容积一定时，分离的细胞产量也高。当已知细胞间存在着明显密度差异（≥0.02g/cc）时，等密度沉降法很理想。细胞密度可以受多方面因素的影响，如吸收制备梯度液所用的介质、细胞在生长周期中所处的时相（平台期细胞密度较高）及所使用的血清等（Freshney，1976）。因为不需要高离心力，等密度沉降法分离细胞可以在1*g*条件下于任何一台离心机上完成。

17.2 细胞体积与沉降速率

细胞沉降还受细胞体积（截面积）的影响，当重力加速度为1*g*时，细胞体积是沉降速度的主要决定因素，高于1*g*时就是重大决定因素了。尽管对于亚微粒子来说，1*g*时微粒大小与沉降速率的关系很复杂，但对于细胞来说相对简单得多，可表示为

$$v \approx r^2/4$$

式中，v为沉降速度，单位为mm/h；r为细胞半径，单位为μmol/L（Miller and Phillips，1969）（表23.3）。

17.2.1 单位重力沉降

将细胞铺放于有血清梯度的介质上，细胞会按照前述公式所示的关系穿过介质而沉降。然而，单位重力沉降法不能处理大量的细胞（按梯度介质表面积计算约1×10^6个/cm^2），也不能获得特别纯的分离，除非细胞的平均体积差异悬殊，而且各细胞群体的体积均一。细胞体积差别大时可用该方法，或是分离细胞聚集体和单个细胞时，如胶原酶消化后（参见方案11.9）。

17.2.2 离心淘洗分离技术

大多数细胞分选可根据细胞体积用离心淘洗（分离纯度中等但产量高）或流式细胞分选（FACS；分离纯度高但产量低；见17.3.2节）。离心淘洗仪（Beckman Coulter）是一种专门设计用来增加沉降速率及提高细胞分离产量和分离纯度的离心与旋转装置（图17.4a）（Lutz et al.,

1992）。当旋转装置旋转时，悬浮于介质溶液中的细胞被泵入分离室，当细胞位于分离室内时，离心力倾向于推动细胞向旋转器的外缘移动（图 17.4b）。同时，介质溶液以向心流速大约等于细胞沉降速率的速度被泵入并流过分离室。如果细胞是相对均一的，它们将保持静止状态；但如果它们在体积、密度及细胞表面形态方面存在差异时，将按照不同的速率沉降。因为沉降室是锥形的，介质流速向着旋转器外缘方向逐渐增加，因此在沉降室内就产生了一个连续的流速梯度区间，不同沉降速率的细胞会因此在沉降室的不同位置达到平衡。沉降室里有频闪灯照明，可以通过一个观察窗口察看。当进行到平衡位置时，介质流速增加，细胞被泵出到收集容器里。细胞可以在完全培养基里被分离，分离后可以直接培养。

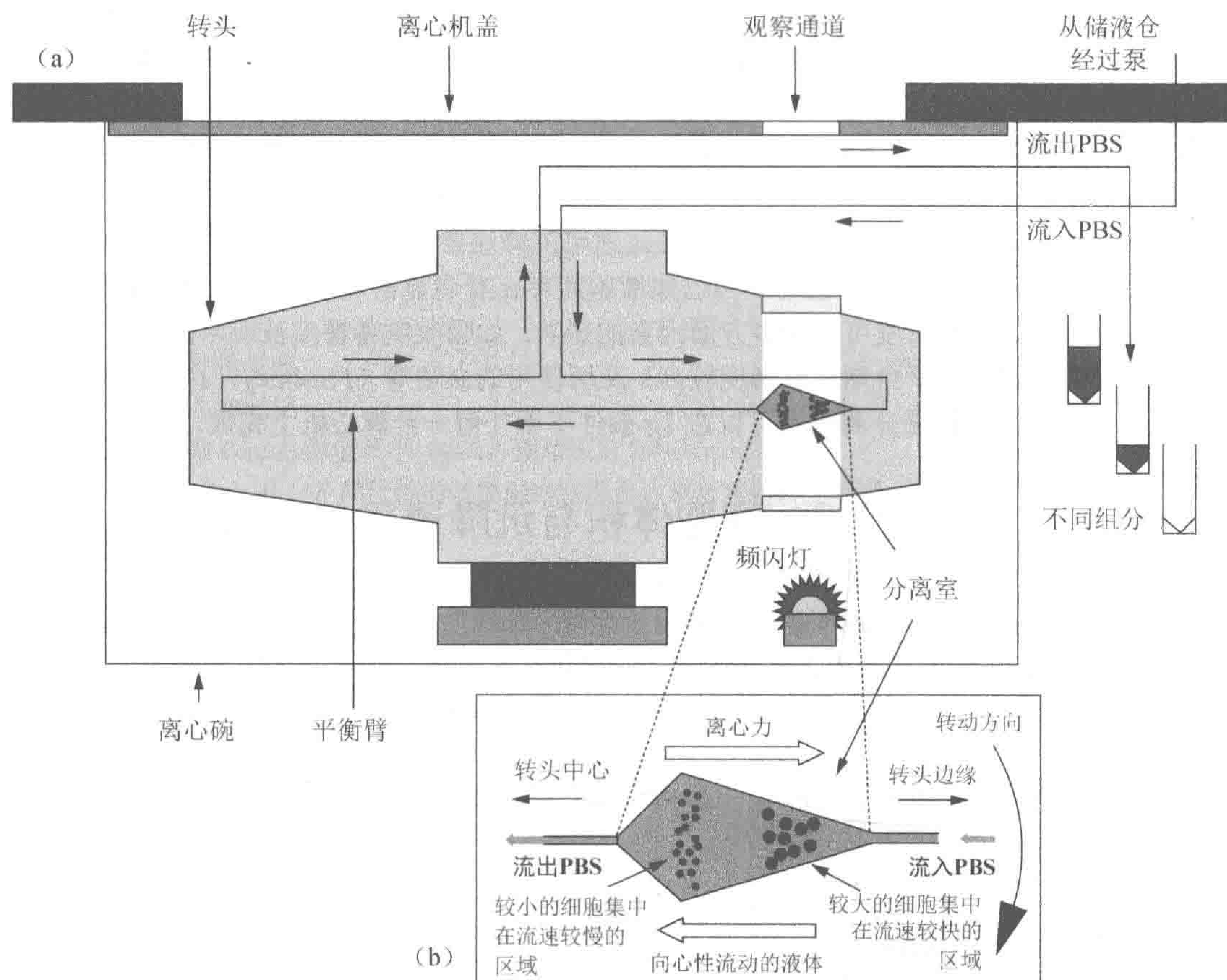


图 17.4 离心淘洗器。离心淘洗转头剖面图（Bechman Coulter），悬于 PBSA 中的细胞进入转头的中心并被泵向边缘，然后进入分离室的外侧边缘，回路经过转头的对侧，保持平衡

操作过程包括 4 个步骤：①准备和消毒仪器；②校准与设定；③上样及建立平衡状态；④收集细胞组分。具体方法在淘洗仪操作手册中有详细的说明（Beckman Coulter）。细胞达到平衡只需几分钟，整个操作过程约耗时 30min，每一个流程可以分离 1×10^8 个细胞，而且操作流程可以按需重复操作。然而，这种仪器是相当昂贵的，而且在能掌握有效分离前需要大量的实践经验。已用此法分离了许多不同类型的细胞，如肺上皮细胞（Lag et al.，1996）、来自脐带的间充质干细胞（MSC）（Majore et al.，2009）、骨髓细胞（Hall et al.，2013），以及处在细胞周期不同时相的细胞（Banfalvi，2008；Barradas et al.，2014）。

17.3 以抗体为基础的分选技术

有多项技术依靠抗体特异性结合到细胞表面。这些技术包括利用针对不需要的细胞的抗体进行的免疫裂解，如上皮性细胞群体中的成纤维细胞（Edwards et al.，1980）、利用免疫毒素进行的免疫打靶（Beattie et al.，1990）、流式细胞分选（参见 17.3.2 节）、磁珠结合抗体的分选（磁活化细胞分选，MACS）（Saalbach et al.，1997）（参见 17.3.1 节）。这些技术依靠选择性抗体的特异性和活细胞表面准确抗原表位的表达，可由免疫染色（参见 18.5.1 节）或流式细胞仪确认（参见 17.3.2 节、18.5.2 节、23.7.2 节）。

17.3.1 免疫磁珠分选

免疫磁珠分选使用针对细胞表面抗原表位的特异性抗体，结合到铁珠，如 Dynabeads（Life Technologies，彩版 23a~c）或微珠（Miltenyi 公司，彩版 23d、e）上。在 Dynal 分离系统中，将悬浮细胞与铁珠混合，再让细胞悬液通过磁场（图 17.5），黏附于铁珠上的细胞被吸到分离室的侧壁上。关掉磁场后，细胞和铁珠就从分离室侧壁上脱离下来，用 FlowComp（Life Technologies）冲洗可将细胞与铁珠分离。美天旎分离系统中，细胞通过免疫学机制与磁铁感应微珠结合，当分离柱置于磁场中时微珠与磁铁环结合（贴到侧臂上），当分离柱离开磁场时微珠脱离（图 17.6）。带有磁珠的细胞可进行培养，并且仍可以贴壁，已用这种方法分离了多种类型的细胞（Zborowski and Chalmers，2007），其中包括阴性筛选法纯化干细胞（Bertoncello et al.，1991）、纯化未分化的人类胚胎干细胞（Fong et al.，2009）、分离肾小管上皮细胞（Carr et al.，1991），以及分离血液单核细胞中的 $CD34^+$细胞（图 17.7b、c）。


彩版23

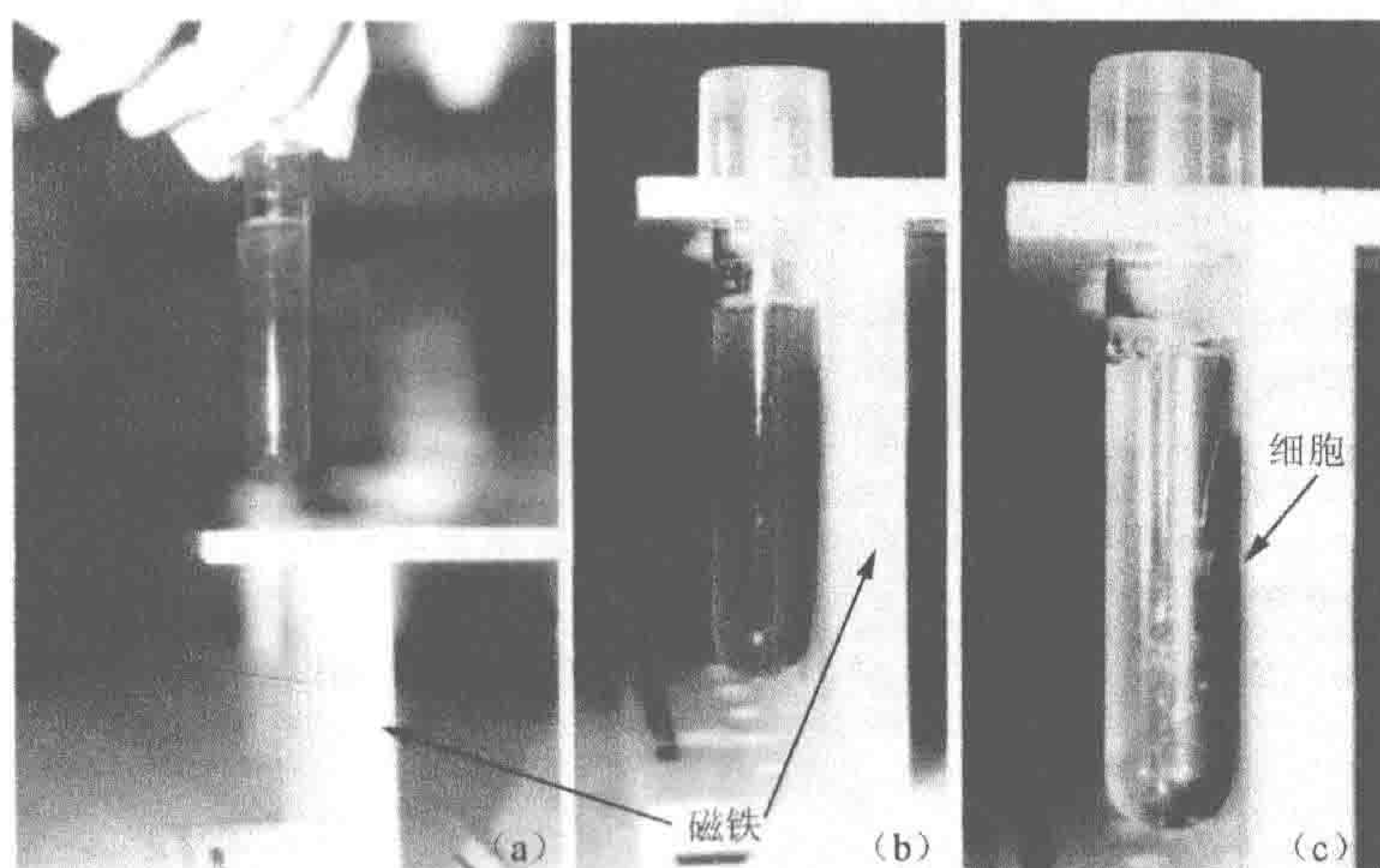


图 17.5 磁力分选法。阴性分选，骨髓悬液中的定向祖细胞结合了携带谱系标记抗体的 Dynal 磁珠。谱系阴性（干）细胞不结合磁珠而保留在悬液里等待流式细胞仪分选。（a）把分选管插入磁场架；（b）刚刚放置于磁场架上的分选管；（c）放置在磁场架上 30s 后的分选管（另见彩版 23a）

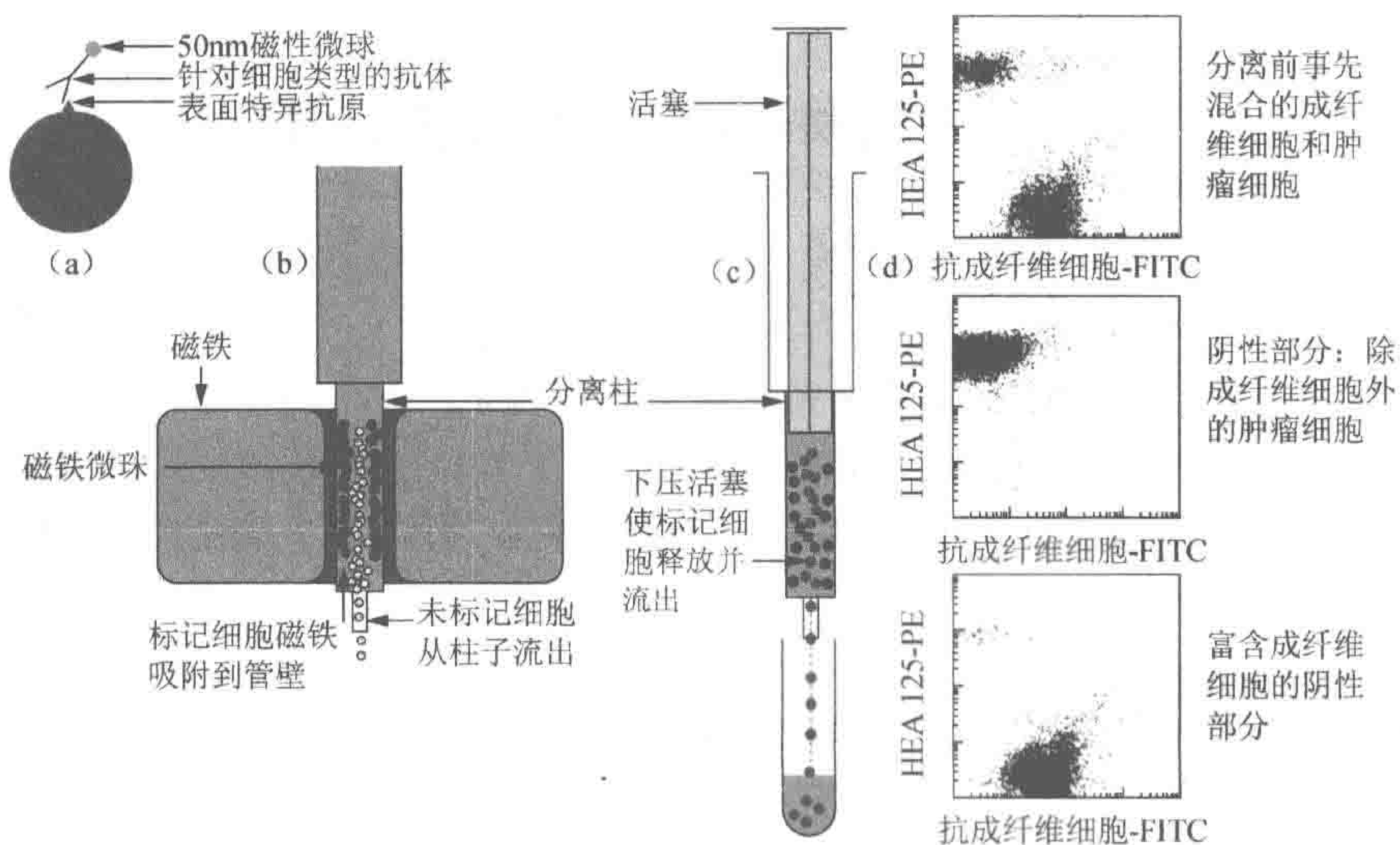


图 17.6 磁性细胞分选法（MACS 技术）阳性分选。（a）细胞事先与抗体培育，该抗体针对细胞类型特异性表面抗原并与磁性微珠结合；（b）当把细胞加入分离柱中，结合了微珠的细胞被磁铁和柱基形成的磁场截留，而未结合的细胞直接流过柱子；（c）磁性结合的细胞在柱子从磁场移开后可用活塞冲洗出去（亦见彩版 23d、e）；（d）含有成纤维细胞的肿瘤细胞培养物的流式细胞仪散点图，MACS 分选前（上），用抗成纤维细胞磁珠 MACS 分选时流出组分如（b），从磁场释放后富集的成纤维组分（下）（另见图 17.7b、c）（d，© Mylteni Biotec，获准使用）

彩版 23

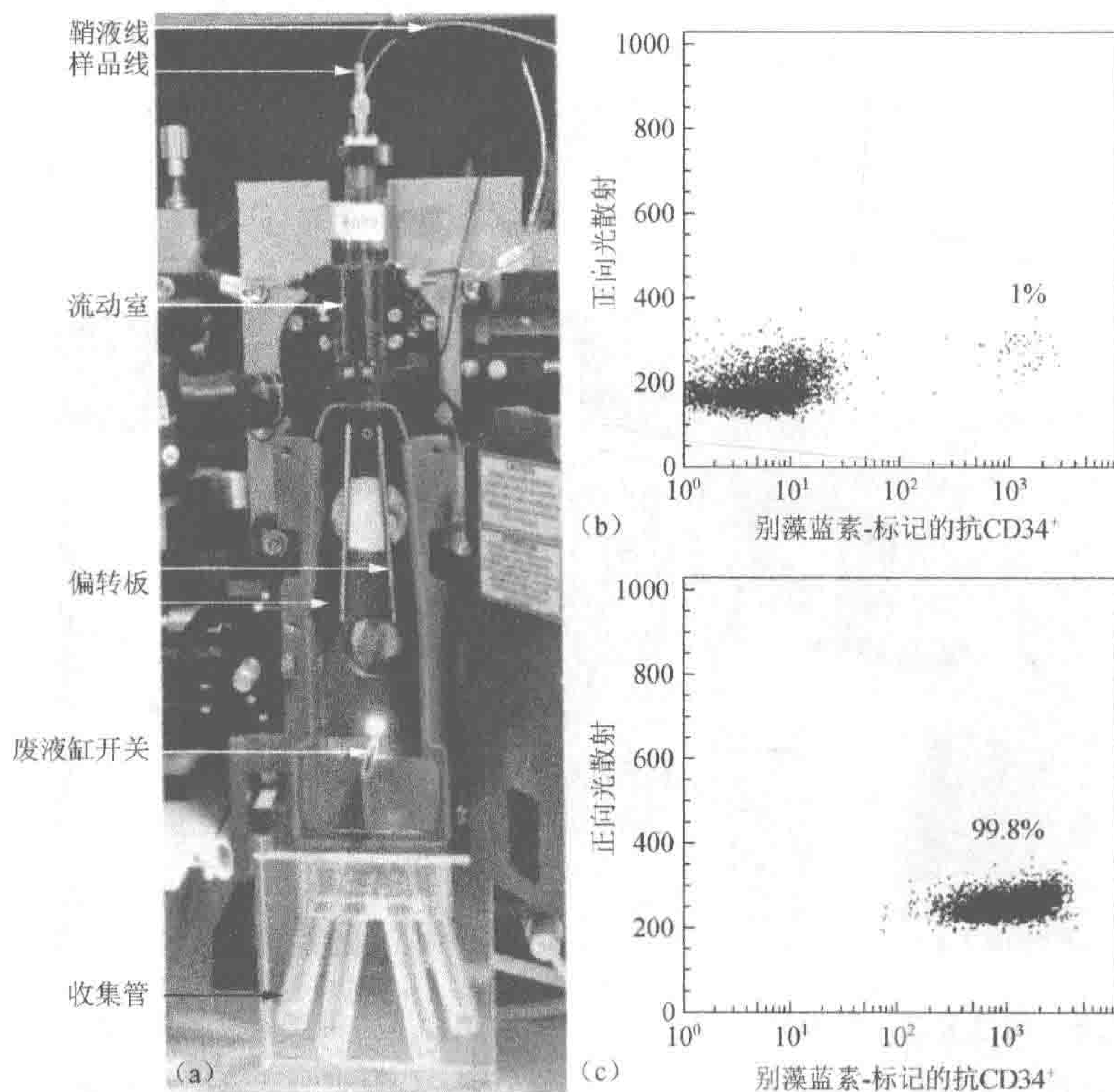


图 17.7 荧光活化的细胞分选法（FACS）。（a）FACSAria（BD Biosciences；另见图 17.8）细胞分选仪全封闭的流动室和分选室。通过偏转板，多达 4 种成分可以收集到底部的收集管中；（b）（c）CliniACS（Mitenyi Biotech）从外周血中分离出白细胞后利用 FACSAria 分析富集 $CD34^+$细胞。（b）富集前 $CD34^+$细胞占整个单核细胞群体的百分率；（c）经 $CD34^+$细胞选择后的纯化细胞（Paul O'Gorman 惠赠，Leukaemia Research Center，Glasgow）

免疫磁性微珠的使用（Gaudernack et al.，1986）（图 17.6，另见彩版 23d、e）允许细胞在不必去除微珠的情况下继续培养或进入其他细胞分离程序（Miltenyi），因此这种方法特别适用于细胞的阳性分离。方案 17.2 是从 Myltenyi 操作指南上摘录的（另见方案 25.17-Su D）。


彩版23

方案 17.2 磁性活化细胞分选法（MACS）

概要

白细胞层（Buffy coat）（血密度梯度离心后）或另一种混合细胞悬液同与抗体连接的微珠混合，稀释后放入一个磁性分离柱中。与微珠结合的细胞受磁铁外壳作用会贴到柱子侧壁上，而未结合磁珠的细胞则从柱子中间流过。将分离柱从磁场移开，结合微珠的细胞就从柱子侧壁上滑落，用针栓从柱中收集。

材料

无菌

- 缓冲液：D-PBSA，pH 7.2，含 0.5% BSA 和 2mmol/L EDTA
- Ficoll Hypaque（参见方案 11.11）
- 孔径 30μm 的尼龙网筛或滤膜（Miltenyi，#414:07）
- 磁性细胞分离器：MiniMACS、MidiMACS、VarioMMMACS，或 SuperMACS（Miltenyi）
- RS^+或 VS^+分离柱适配器
- 阳性选择柱：MS^+/RS^+柱用于 1×10^7 个细胞；LS^+/VS^+柱用于 1×10^8 个细胞
- 与针对细胞表面抗原的抗体相连接的磁性微珠
- 符合收集容积的收集器：MS^+/RS^+ 1mL；LS^+/VS^+ 5mL

操作步骤

标记

1. 按照标准方法分离外周血单个核细胞（参见方案 25.22-Su）或经酶消化法及其他方法（参见方案 11.5~方案 11.10、方案 12.3、方案 12.5）制备的细胞悬液。
2. 用 Ficoll-Paque 去除死细胞（参见方案 11.11）。
3. 用尼龙网筛或滤膜过滤细胞去除细胞团块（滤膜应用前用缓冲液湿润）。
4. 缓冲液洗涤细胞，离心。
5. 重新悬浮离心细胞，每 10^7 个细胞悬浮于 80μL 缓冲液（80μL 为最低限量，即使总细胞数低于 10^7 个）。
6. 按每 10^7 个细胞加微珠标记液 20μL。
7. 混匀，6~12℃培育 15min（对于更少的细胞，用同样体积）。
8. 加入 10~20 倍于步骤 5 的缓冲液体积稀释细胞悬液。
9. 300*g* 离心 10min。
10. 去上清，按每 10^8 个细胞加缓冲液 500μL 重新悬浮结合了微珠的细胞。

阳性磁性分离

11. 将分离柱放入 MACS 分离器的磁场中。

12．洗柱：MS^+/RS^+ 500μL；LS^+/VS^+ 3mL。

13．将细胞悬液加入分离柱中：MS^+/RS^+ 500~1000μL；LS^+/VS^+ 1~10mL。

14．让阴性细胞流过分离柱。

15．用缓冲液淋洗柱子：MS^+/RS^+ 3×500μL；LS^+/VS^+ 3×3mL。

16．将分离柱从分离器中取出放置在收集管上。

17．用吸管加适量缓冲液于柱中（MS^+/RS^+ 1mL；LS^+/VS^+ 5mL），推动针管式活塞冲出阳性标记细胞。

18．细胞计数，用生长培养液调整浓度：

（a）原代培养调整为 1×10^5~1×10^6/mL，接种于培养瓶。

（b）克隆化培养调整为 10~1000 个/mL，接种于培养皿。

17.3.2 荧光活化的细胞分选法

荧光活化的细胞分选（Hoffman and Houck，1997）使单细胞一个接一个地通过一个激光束，激光在细胞表面产生光散射，散射的光信号被一个或多个光信号放大器采集并记录下来（图 17.8）。如

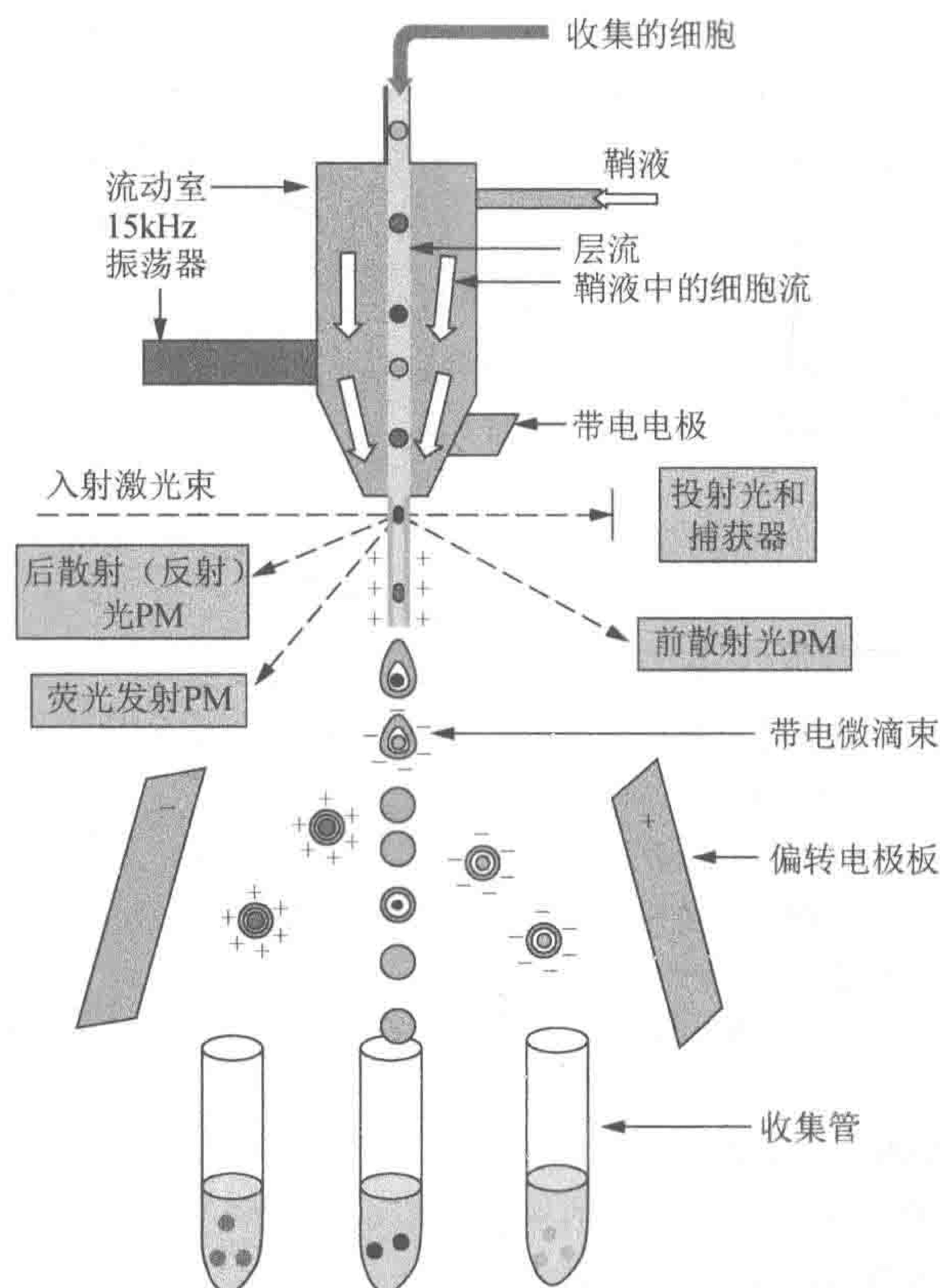


图 17.8 流式细胞仪。流式细胞仪的原理。D-PBSA 稀释的细胞流从顶部进入，然后是鞘液，仍是 D-PBSA，注入细胞流的外周，在流动室内产生层流。当细胞流流出流动室后，剪切激光束，产生的信号激发充电电极，使细胞流充电。同时细胞流在一个与流动室相连的 15kHz 振荡器的作用下被打散成微滴。带电微滴主要帮助细胞流流出并在流动室下方的电极板作用下发生偏转。待细胞从剪切激光束进入电极板之后，再进行电极板通电（另见图 17.7）

果细胞在分离前事先用荧光染料［如碘化丙啶或色霉素 A_3（chromomycin A_3）标记DNA］或荧光探针或荧光抗体处理，受激光激发后，荧光物质被激活并散发荧光信号，荧光信号被下一级光信号倍增管测量放大，所获得的信号最后被计算机处理加工并以点阵图（例如，见图17.6d、b、c，图23.7）或一些其他的形式显示出来（Shapiro，2003；Applied Cytometry，2008）。

流式细胞仪 是一种细胞分析装置，用来加工处理光倍增管输出的信号，以分析某个细胞群体的组成（例如，要测量位于细胞周期不同时相的细胞的比例，可以联合应用DNA荧光技术及细胞体积测量法）（Krueger and Wilson，2011）。

荧光活化细胞分选仪（FACS；如FACSAria、BD Biosciences） 是一种借助来自各个细胞的荧光发射信号而把细胞分类收集于4个样本收集管之一及一个废液缸内的装置。如果设定了特殊的同类化条件来描述显示结果（"设门，gating"），细胞分选仪会把那些符合条件（如高光散度或低光散度、高荧光性或低荧光性）的细胞分类输送到位于细胞流下面的相应的收集管中。细胞流本身被一种作用于流动室的高频振荡打散成一个个微小的液滴，这些微滴含有携带某种特殊性质的单个细胞，当它们离开流动室时被充电以带上电荷。当带电微滴通过两块带电性质相反的偏转板时，会按照各自所带电荷的不同而向左或向右发生偏转。短暂通电设定在微滴切断激光束时，这样包含某一特殊标记细胞的带电微滴就会发生偏转流入收集容器里。细胞流中的细胞浓度必须足够低以使细胞间的空隙足够大而避免两个细胞被纳入同一个微滴。所有性质相似的细胞被收集到同一个收集管中，并且通过改变细胞流的极性使细胞发生适当偏转，可同时收集到4种细胞。

流式细胞仪分选细胞可以根据任何能够探测到的散射光（如细胞体积）或荧光（如DNA、RNA或蛋白含量；酶活性；特异抗原）散射度的差异来分离细胞。此法已应用于多种细胞类型的分选，最广泛应用于造血细胞的分离（Yeung and Wai Eric So，2009），因为把它们分散成必要的单细胞悬液相对简单。但是该法也常用于实体组织，如肺（Raiser and Kim，2009）、皮肤（Nowak and Fuchs，2009）及心脏（Ieda et al.，2009）细胞的分离。这是一个极其强大的工具，但分离细胞的产量受到一定限制（一次分离的最大合理限量约 10^7 个细胞）。然而这种较复杂的具备细胞分离能力的仪器花费昂贵，而且它还需要专职的有技术的操作员。也有较便宜的分析用台式机（如Guava；Accuri）。

17.4 初试细胞分离者的选择

初试者最好先从简单的技术如密度梯度离心法入手，或者在特异性细胞表面表型能够预测的情况下，可使用免疫磁珠法（MACS）的阴性或者阳性选择。如果细胞纯度不高或分离产量不够，那么则有必要借助于流式细胞术（FACS）或离心淘洗法。离心淘洗法对于快速分离大规模的细胞很有用。而在联合设定两种或两种以上严格标准的基础上，流式细胞分选法则能分离出最纯的细胞群。

当需要一种高纯度细胞悬液纯化而选择性培养又无法进行时，就有必要使用至少两步的细胞分离法，同蛋白质纯化过程类似。在许多诸如此类的方法中，免疫磁珠法（MACS）用作第一步，最后用流式细胞分选（FACS）纯化，如胚胎干细胞的分离（Fong et al.，2009）（另见方案26.10-Su）。

参考文献

Applied Cytometry (2008). *Flow cytometry* (www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php#cell).

Banfalvi G (2008). Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat. Protoc.* 3:663–673.

Barradas OP, Jandt U, Becker M, Bahnemann J, Pörtner R, Zeng AP (2014). Synchronized mammalian cell culture: Part I–A physical strategy for synchronized cultivation under physiological conditions. *Biotechnol. Progress (PMID*: 25044769).

Beattie GM, Lappi DA, Baird A, Hayek A (1990). Selective elimination of fibroblasts from pancreatic islet monolayers by basic fibroblast growth factor-saporin mitotoxin. *Diabetes* 39:1002–1005.

Bertoncello I, Bradley TR, Watt SM (1991). An improved negative immunomagnetic selection strategy for the purification of primitive hemopoietic cells from normal bone marrow. *Exp. Hematol.* 19:95–100.

Calder CJ, Liversidge J, Dick AD (2004). Murine respiratory tract dendritic cells: Isolation, phenotyping and functional studies. *J. Immunol. Methods* 287:67–77.

Carr T, Evans P, Campbell S, Bass P, Albano J (1999). Culture of human renal tubular cells: Positive selection of kallikrein-containing cells. *Immunopharmacology* 44:161–167.

Edwards PAW, Easty DM, Foster CS (1980). Selective culture of epithelioid cells from a human squamous carcinoma using a monoclonal antibody to kill fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* 4:917–922.

Fong CY, Peh GS, Gauthaman K, Bongso A (2009). Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev. Rep.* 5:72–80.

Freshney RI (1976). Separation of cultured cells by isopycnic centrifugation in metrizamide gradients. In RickwoodD (ed.), *Biological separations*. London and Washington, DC: Information Retrieval, pp. 123–130.

Gaudernack T, Leivestad T, Ugelstad J, Thorsby E (1986). Isolation of pure functionally active CD8+ T cells. Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres. *J. Immunol. Methods* 90:179–187.

Hall SR, Jiang Y, Leary E, Yavanian G, Eminli S, O'Neill DW, Marasco WA (2013). Identification and isolation of small CD44-negative mesenchymal stem/progenitor cells from human bone marrow using elutriation and polychromatic flow cytometry. *Stem Cells Transl. Med.* 2:567–578.

Hoffman RA, Houck DW (1997). Cell separation using flow cytometric cell sorting. In mRecktenwaldD, RadbruchA (eds.), *Cell separation methods and applications*. New York: Marcel Dekker, pp. 237–270.

Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D (2009). Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev. Cell* 6:233–244.

Krueger SA, Wilson GD (2011). Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods Mol. Biol.* 731:359–370.

Lag M, Becher R, Samuelsen JT, Wiger R, Refsnes M, Huitfeldt HS, Schwarze PE (1996). Expression of CYP2B1 in freshly isolated and proliferating cultures of epithelial rat lung cells. *Exp. Lung Res.* 22:627–649.

Li N, Zhang Y, Liu Y, Xiu Z, Tan M, Li S, Guo X, Wang Y, Chen L, Song Y, Yu W, Lv G, Ma X (2014). Improved islet purity by the hypertonic-hypotonic method. *Int. J. Artif. Organs* 37:477–485.

Lutz MP, Gaedicke G, Hartmann W (1992). Large-scale cell separation by centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 200:376–380.

Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C (2009). Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun. Signal.* 7:6.

Miller RG, Phillips RA (1969). Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.* 73:191–201.

Munthe-Kaas AC, Seglen PO (1974). The use of metrizamide as a gradient medium for isopycnic separation of rat liver cells. *FEBS Lett.* 43:252–256.

Nowak JA, Fuchs E (2009). Isolation and culture of epithelial stem cells. *Methods Mol. Biol.* 482:215–232.

Pertoft H, Laurent TC (1982). Sedimentation of cells in colloidal silica (Percoll). In PretlowTG, PretlowTP (eds.), *Cell separation, methods and selected applications*, Vol. 1. New York: Academic Press, pp. 115–152.

Pramod RK, Mitra A (2014). In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (Capra hircus). *J. Assist. Reprod. Genet.* (PMID: 24958548).

Pretlow TG, Pretlow TP (1989). Cell separation by gradient centrifugation methods. *Methods Enzymol.* 171:462–482.

Raiser DM, Kim CF (2009). Sca-1 and cells of the lung: A matter of different sorts. *Stem Cells* 27(3):606–611.

Recktenwald D (ed.) (1997). *Cell separation methods and applications*. New York: Marcel Dekker.

Rickwood D, Birnie GD (1975). Metrizamide, a new density gradient medium. *FEBS Lett.* 50:102–110.

Saalbach A, Aust G, Haustein UF, Herrmann K, Anderegg U (1997). The fibroblast-specific MAb AS02: A novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 290:593–599.

Shapiro H (2003). *Practical flow cytometry*. Hoboken, NJ: Wiley.

Splinter TAW, Beudeker M, Beek AV (1978). Changes in cell density induced by isopaque. *Exp. Cell Res.* 111:245–251.

Sykes JA, Whitescarver J, Briggs L, Anson JH (1970). Separation of tumor cells from fibroblasts with use of discontinuous density gradients. *J. Natl. Cancer Inst.* 44:855–864.

Weiskirchen R, Gressner AM (2005). Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol. Med.* 117:99–113.

Yeung J, Wai Eric So AC (2009). Identification and characterization of hematopoietic stem and progenitor cell populations in mouse bone marrow by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 538:1–15.

Zborowski M, Chalmers JJ (2007). *Magnetic cell separation. Vol. 32. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Elsevier.

（杨振丽　刘玉琴　译）

第 18 章

细胞系鉴定

18.1 鉴定的需求

细胞系的鉴定主要有 3 个方面的要求。

（1）身份。该细胞系是否还是被认定的细胞系？这需要真实性验证（参见 13.1 节）来证明该细胞没有被交叉污染或者错误认定。真实性验证需要确认其来源种属，提供出处，如细胞系来源和建系的历史，也可以提供组织供给个体的信息（年龄、性别、病理）。来源于同一供者或者同一种近交系实验动物的细胞系，总是很难区分，需要特异性的标记物。

（2）功能。该细胞系来源于哪种组织和哪种细胞类型，是否表达你所期望的那种组织或细胞的特性？这由细胞所处的发育阶段决定，例如，在某种特殊谱系中所处的位置——是干细胞、前体细胞，或者是完全分化的细胞，这将影响培养的微环境。

（3）稳定性。

(a) 表型。在标准条件下生长时该细胞是否显示相同的特性？这种条件很难是“稳定状态”，因为就其特性，传代细胞会根据其处于生长周期的哪个阶段、自分离以来如何演进而发生改变，这对于早期代数的细胞尤其重要（参见 19.1.1 节）。或许，最接近稳定状态的是在灌注高密度、不增殖培养或在生物反应器中（参见 21.1.1 节）。

(b) 基因型。除了进化上的改变，随着细胞系的生长，细胞更易于转化（参见 22.2 节），从一个正常的有限传代细胞变为无限传代的，甚至是恶性转化的细胞（参见 22.3 节、22.4 节、22.5 节）。大多数正常的有限传代的细胞系基因是稳定的，但是如果在起源或者体外操作的过程中已经发生了转化，这些细胞将容易增加遗传不稳定性。

(i) 该细胞系是有限传代细胞系还是连续传代细胞系？（参见 22.3 节、短篇综述 22.1）

(ii) 该细胞系是否表达恶性特征？（参见 22.5 节、21.6 节）

18.2 基因型鉴定

DNA 总含量可以通过流式细胞仪来分析（Krueger and Wilson，2011），可用于区分正常与转化细胞（参见 22.2.2 节）。然而，随着人类基因组测序（IHGSG 2001），DNA 测序几乎成了细胞系鉴定的常规方法，可以完整定义基因组。已经为一系列的细胞系建立了大量的数据库，主要在与癌症相关的突变上（例如，COSMIC 数据库与细胞系百科全书）。这一技术的方法学和说明超

出了本书的范畴，但是许多综述可以用于人（如 Martins-Taylor and Xu，2012）或者小鼠（Yalcin et al.，2012）细胞系。

18.2.1 真实性验证

细胞系的鉴定是至关重要的，不仅决定其所具有的功能，而且也证明其真实性。我们应特别注意细胞系被已有的连续细胞系污染的可能性，或由于标记错误、处理混乱而错认。这是一个非常严重的问题，在第 13 章单独阐述（参见 13.1 节；表 13.1；ICLAC 数据库）。真实性验证的过程必须要引入任何与细胞系相关的工作中，尤其是那些新获得的细胞系。

18.2.2 种属鉴定

种属来源的确认一般认为是真实性验证过程的一部分，在第 13 章阐述（参见 13.1.6 节）。染色体分析（参见方案 13.4、方案 26.5-Su）是区分物种最佳的传统方法，可以识别个别细胞系特异的染色体标记。染色体分带用来区分单条染色体，而染色体彩绘技术，即用特异性分子探针组合与某条染色体的特定区域杂交（参见 13.1.9 节），进一步增加了染色体分析技术的分辨率和特异性。这些探针识别特定的某对染色体且具有种属特异性。目前，可供利用的探针仅限几个物种，而且多为人或小鼠。但染色体彩绘用于区分人和小鼠的染色体及物种间杂交是一种很好的办法。同工酶电泳（参见方案 13.3）、线粒体 DNA 的多态性分析，也称 DNA 条码（DNA barcoding）（参见 13.1.6 节）也用于种属的识别。

18.2.3 转化

转化是细胞系鉴定的一个主要指标，将另作叙述（参见 22.1 节）。

18.3 表型鉴定

细胞的潜在表型是由该细胞中表达的基因，即转录组决定的。实际的表型定义为①形态，包括染色的和未染色的细胞在低倍和高倍显微镜下的形态，以及细胞生长至肉眼可见或者低倍镜下观察到的任何模式；②蛋白质组，是细胞合成的所有蛋白质的组合；③代谢组，即证明在该细胞内活跃的代谢通路；④某些类型的细胞特异的性质和功能的展示，包括膜运输、分泌、膜电位的产生与传递、收缩、迁移、组织学分化等特性，也包括那些暗示 1~3 个因素但是没有被实践证明的特性。利用芯片技术可以同时监测更广泛的细胞特性，得到该细胞系特异的表型芯片（Biolog-表型芯片）。然而，用于鉴定的这一技术的本质常常依赖于正在进行的工作类型和细胞预期的功能，可能局限于一种或两种特性。另外，许多一般特性可以确定细胞的谱系和分化状态。

18.3.1 谱系或组织标记

细胞沿着某个分化路径向某种特定分化的细胞类型分化可以看作一个谱系。而且，随着细胞沿着该路径分化，这些细胞获得了谱系特异性的标记，与干细胞表达的标记是不同的。谱系标记在

确定某细胞系与其组织来源的关系时非常有帮助，包括中间纤维蛋白和一系列的细胞表面抗原。

干细胞标记 谱系标记常常是随着细胞向特定的谱系分化而表达的，在干细胞不表达（Zhang et al.，2013）。另一方面，干细胞有着自己的标记，如细胞表面标记物 SSEA-1 和转录因子 NANOG、OCT-4（参见表 26.1）。造血干细胞表面标记是最早被阐明的（Nakajima-Takaji et al.，2014）（短篇综述 26.1，表 26.2）。在成体上皮干细胞表达的另一组标记物是含有富亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体家族（Barker et al.，2013）。

中间纤维蛋白 中间纤维蛋白是应用最广泛的谱系或组织标记（Lane，1982；Ramaekers et al.，1982）。胶质纤维酸性蛋白（GFAP）标记星形胶质细胞（Bignami et al.，1980）（参见彩版 11b）；结蛋白标记肌细胞（Bochaton-Piallat et al.，1992；Brouty-Boyé et al.，1992）是最特异的；细胞角蛋白标记上皮细胞（Lane，1982；Moll et al.，1982）（参见彩版 11a）和间皮（Wu et al.，1982）；神经纤维蛋白标记神经元（Kondo and Raff，2000）和一些神经内分泌细胞（Bishop et al.，1988）。波形蛋白（参见彩版 11a、c）通常在体内表达局限于中胚层来源的细胞，但在体外也可见于其他类型的细胞。


彩版 11

细胞表面抗原 这些标记对造血细胞的分选特别有用（Edvardsson and Olofsson，2009），而且通过抗体，如抗 EMA（Heyderman et al.，1979）和抗 HMFG1、HMFG2（Burchell and Taylor-Papadimitriou，1989），区分上皮和间充质来源的基质、区分上皮谱系（Petersen et al.，2003；Labarge et al.，2007）和鉴定神经外胚层来源的细胞（如通过抗 A2B5 的抗体）时也很有效（Dickson et al.，1983）。

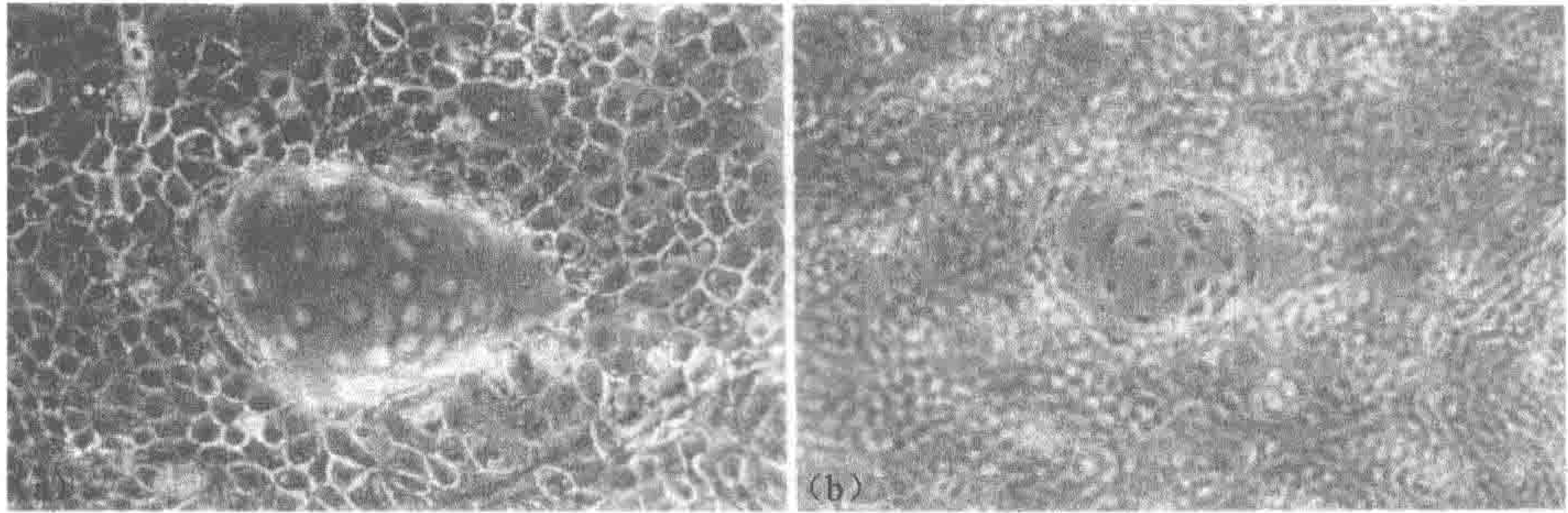
分化的产物和功能 分化标记的确定有 3 个层次：①通过大规模基因表达芯片分选（Affymetrix）完成的 RT-PCR 判断特异性基因的转录（如 Sarang et al.，2003；Le Page et al.，2006；Kiefer et al.，2004）（彩版 24a）；②通过特异性的抗体确定某特定蛋白的表达（如 Barber et al.，2009）；③活性，如酶活性（底物转化为产物，见下文）、转运活性（如葡萄糖的摄取），或者是受体结合配体（通过饱和结合动力学或下游信号转导来测定）。前两个层次属于利用芯片技术进行广谱分析的范畴，唯有活性的分析才能证明功能蛋白的存在，从而确认分化表型。分化表型可能不是组成性的表达，且随着细胞增殖很可能是不表达，所以这些标记物的表达可能需要诱导。许多分化产物的表达水平要受诸如营养素、激素、基质和相邻细胞等环境因素的调控（参见 19.7 节）。因此，测定特定细胞谱系的标记可能需要细胞在一定条件下预孵育，如氢化可的松等激素、特定的生长因子，或是让细胞生长在合适类型的细胞外基质上。分化的调控将在下一章中涉及（参见 19.7 节）。


彩版 24

血红蛋白标记红细胞、肌球蛋白或原肌球蛋白标记肌细胞，黑色素标记黑素细胞，血清白蛋白标记肝细胞，这些都是特定细胞类型标记的最好例子，但同所有的分化标记一样，都依赖于分化表型的完全表达（参见 19.7 节）。无机离子的运输及相应的水的转运是某些吸收和分泌上皮的特性（Abaza et al.，1974；Lever，1986）；单层生长的某些上皮可产生隆凸，在单层细胞中呈半囊泡状，是单层细胞下水分积聚所形成的（Rabito et al.，1980）（图 18.1，另见彩版 12a、b）。采用 Boyden 小室或多孔板插入式滤膜小室（参见 20.3.9 节）的方法也证明在上皮和内皮细胞中存在极性运输。其他可以在体外表达的组织特异的功能包括肌肉收缩和神经细胞膜的去极化。


彩版 12

酶类 在酶的特性鉴定方面有 3 种可行的参数：基础水平（如没有诱导物或阻抑物的情况下）、诱导或适应水平（对诱导物和阻抑物的反应）和同工酶多态性（参见 13.1.7 节）。肌酸激酶（CK）MM 型同工酶存在于肌肉，而 CKBB 型同工酶是神经元和神经内分泌细胞所特有，属于神经元特异的烯醇化酶；乳酸脱氢酶存在于大多数的组织中，但是有不同的同工酶；由地塞米松诱导出高水平的酪氨酸转氨酶，一般认为是肝细胞所特有的（表 18.1）（Granner et al.，1968）。




彩版 12

图 18.1 隆凸。(a) 隆凸或半囊泡，通过单层上皮向下运输离子和水而形成，较低处聚焦（单层上皮平面）；(b) 在上方聚焦（顶面观）（另见彩版 12a、b）

表 18.1 酶标记物

酶	细胞类型	诱导物	阻抑物	参考文献
碱性磷酸酶	Ⅱ型肺泡上皮（肺泡）	地塞米松，制瘤素，IL-6	TGF-β	Edelson et al., 1988; McCormic and Freshney, 2000
碱性磷酸酶	肠上皮细胞	地塞米松，NaBt		Vachon et al., 1996
血管紧张素转化酶	内皮	胶原，Matrigel		Del Vecchio and Smith, 1981
肌酸激酶 BB	神经元，神经内分泌细胞，SCLC			Gazdar et al., 1981
肌酸激酶 MM	肌肉细胞	IGF-Ⅱ	FGF-1,2,7	Stewart et al., 1996
多巴-脱羧酶	神经元，SCLC			Chung et al., 2006; Gazdar et al., 1980
谷氨酰合成酶	星形胶质细胞（脑）	氢化可的松	谷氨酰胺	Hallermeyer and Hamprecht, 1984
神经特异性烯醇化酶	神经元，神经内分泌细胞			Hansson et al., 1984
非特异性酯酶	巨噬细胞	PMA，维生素 D_3		Murao et al., 1983
脯氨酸羟化酶	成纤维细胞	维生素 C		Pinnel et al., 1987
蔗糖酶	肠上皮细胞	NaBt		Pignata et al., 1994; Vachon et al., 1996
酪氨酸酶	黑素细胞	cAMP		Park et al., 1993, 1999
酪氨酸氨基转移酶	肝细胞	氢化可的松		Granner et al., 1968

调节作用 酶活性可在多个水平调节，包括基因转录、mRNA 加工、蛋白质合成和酶活性的激活与抑制。肝细胞中酪氨酸氨基转移酶和神经胶质中谷氨酰胺合成酶最大量的表达都需要地塞米松提前诱导。谷氨酰胺合成酶也受谷氨酰胺的抑制，所以谷氨酸盐应该在分析前 48h 从培养基中换掉（DeMars，1957）。传统上酶的水平是通过酶活性的检测来确定；现在调节活性更多可能是通过特异基因表达或总酶蛋白的免疫分析来检测。然而，完整功能只能通过恰当的实验测定活性来确认。

细胞谱系的忠实性 尽管上述许多标记物被认为是细胞谱系的标记物，但把它们作为组织或细胞类型的标记更恰当一些，因为比起胚胎起源来，这些标记更代表细胞功能。细胞角蛋白可见于间皮和肾上皮，因为这两种组织都起源于中胚层。神经特异的烯醇化酶和肌酸激酶 BB 在肺的神经内分泌细胞表达，现已确认这些神经内分泌细胞源自内胚层，而不是如人们预期的神经内分泌类细胞来自神经外胚层。转化的上皮细胞可以表达波形蛋白，同时有或没有细胞角蛋白的表达，如上皮-间质转换（Kokkinos et al.，2007；Gregory et al.，2008）。

18.3.2 独特标记物

独特标记物包括特异的染色体畸变（如缺失、易位、多染色体）、具有高度多态性的主要组织相容性（MHC）抗原（如人类HLA）和STR DNA谱（参见方案13.1）及SNP分析（Liang-Chu et al., 2015）。酶缺乏［如胸腺嘧啶脱氧核苷酸激酶缺乏（TK^-）］和抗药性［如长春花碱抗药性（经常与编码外转运蛋白的*mdr*基因所表达的P-糖蛋白偶联）］，虽并非真正独特，但可以区分来自不同供者的同种组织的细胞系，尤其是在暴露于细胞毒素后。

18.4 细胞形态学

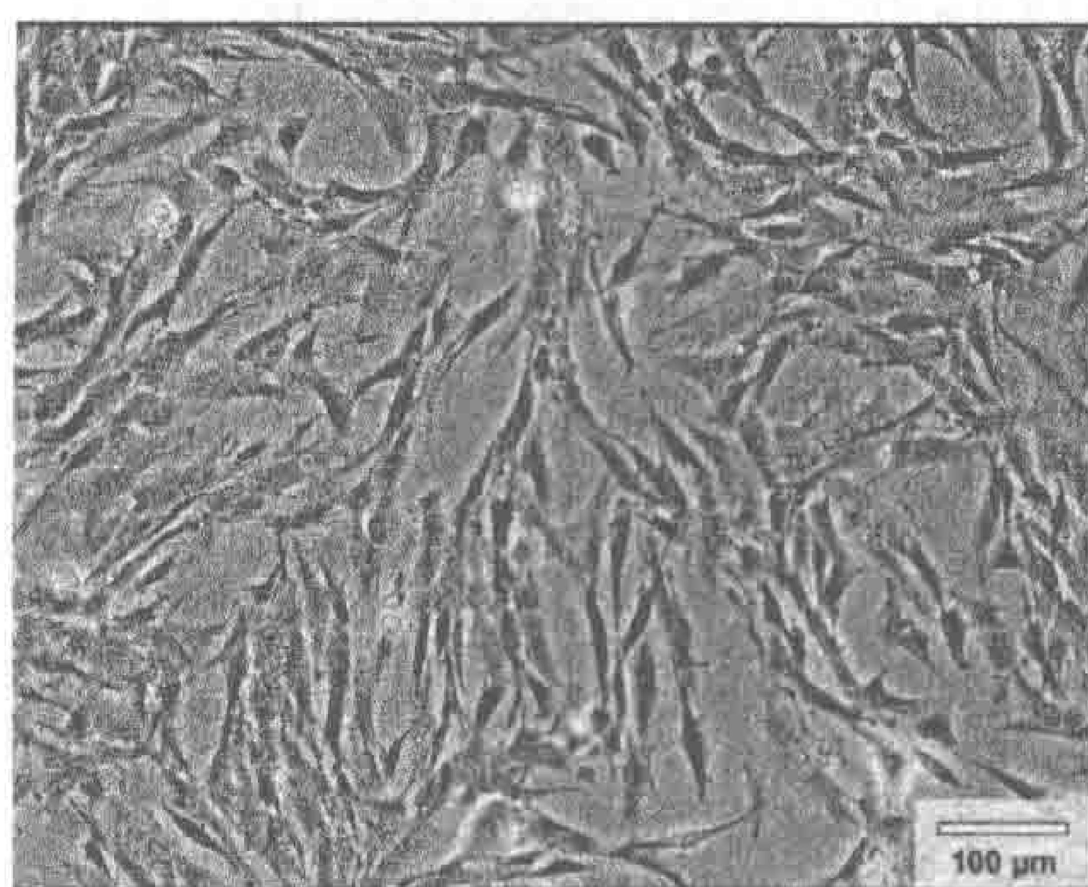
形态观察是辨别细胞最简单、最直接的技术，但我们也应认识到它有一定的缺陷，这些缺陷多数与不同培养条件下细胞形态的可塑性有关。例如，在汇合成片的中心部位生长的上皮细胞，一般形态规则，呈多角形，而且边缘清晰明确；而同样的细胞，生长在小片的边缘，形态就会不规则，伸展。如果发生转化，细胞就会从小片上脱离，变为成纤维细胞样的形态（参见彩版1a、c）。


彩版1

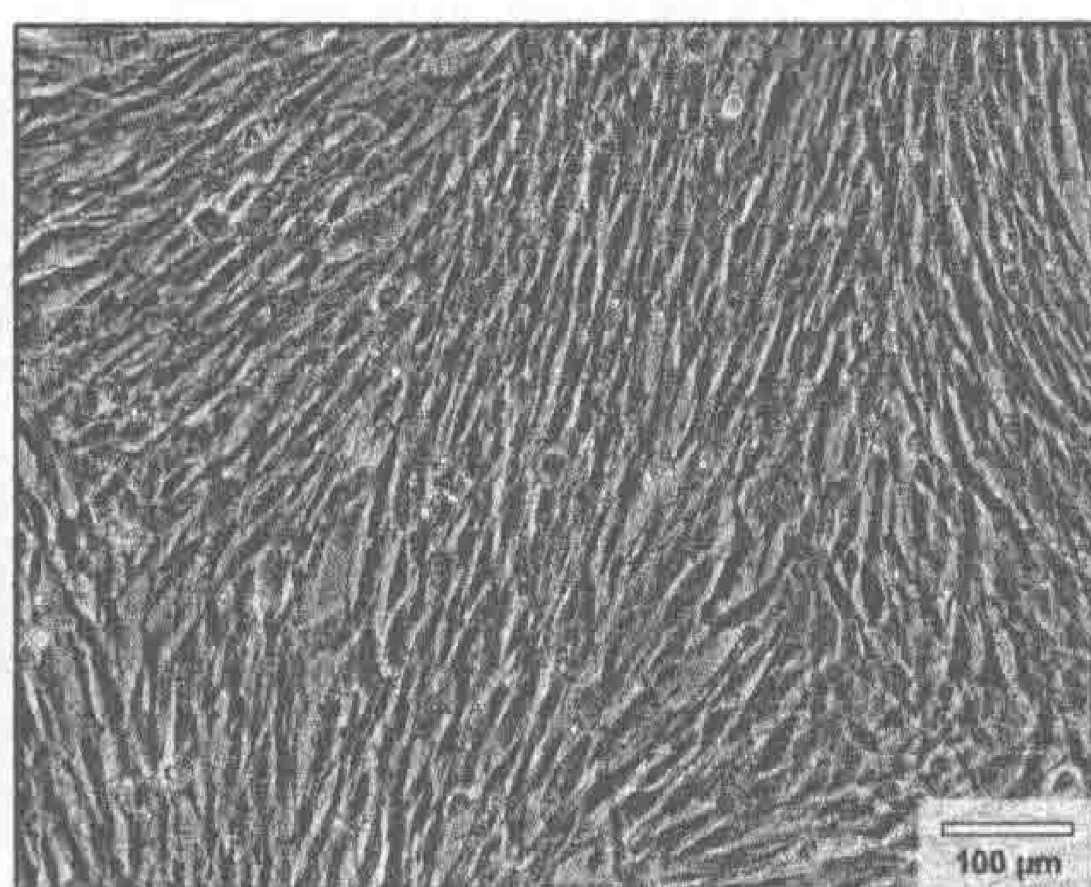
亚汇合状态的仓鼠肾、人肺或人皮肤的成纤维细胞呈多极或双极状（图18.2a、g，另见彩版8a），而且在培养器皿表面铺展较好，但在汇合时则为双极且铺展欠佳（图18.2b、h，另见彩版8b，彩版10d、e）。这些细胞常常形成肉眼可辨的特征性平行排列和旋涡（参见彩版10c）。小鼠3T3细胞（图18.2s、t）在细胞密度低时呈多极化成纤维细胞样，但汇合时呈上皮样生长（图18.2v、w，另见彩版10b）。基质改变（Gospodarowicz et al.，1978b；Freshney，1980）和培养基成分改变（参


彩版8

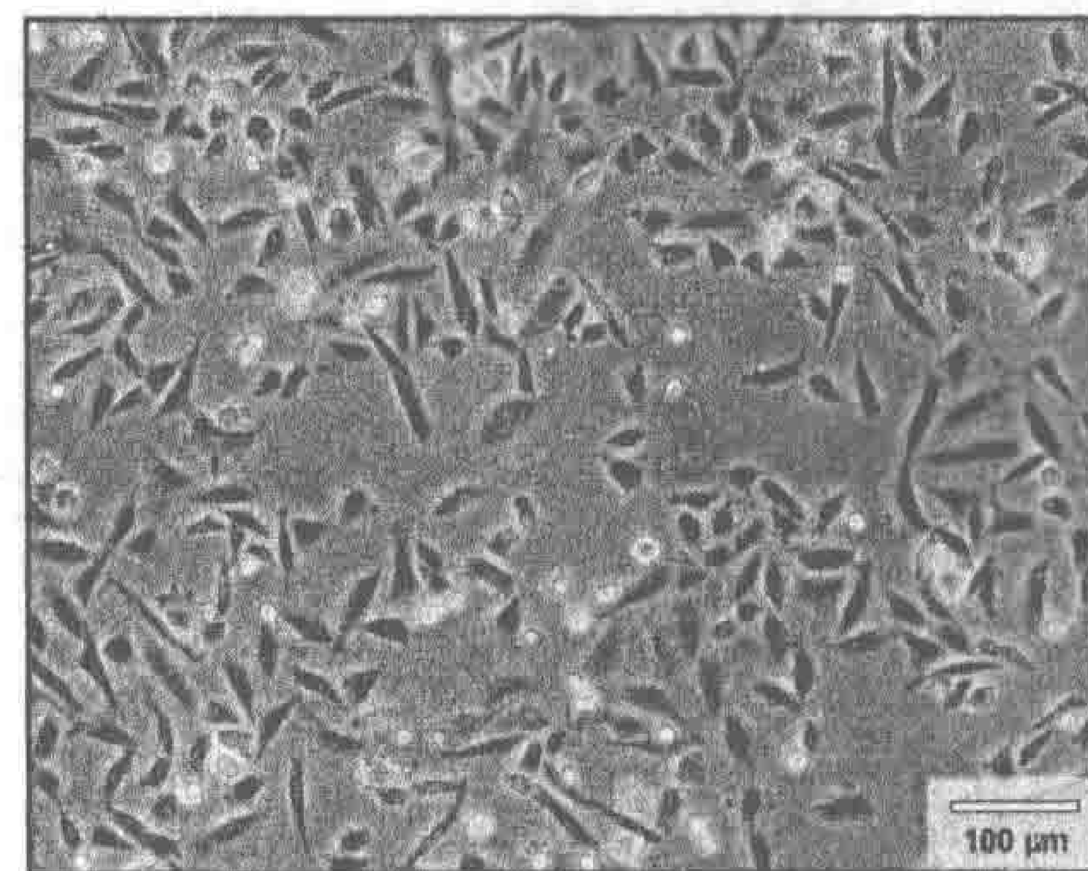

彩版10



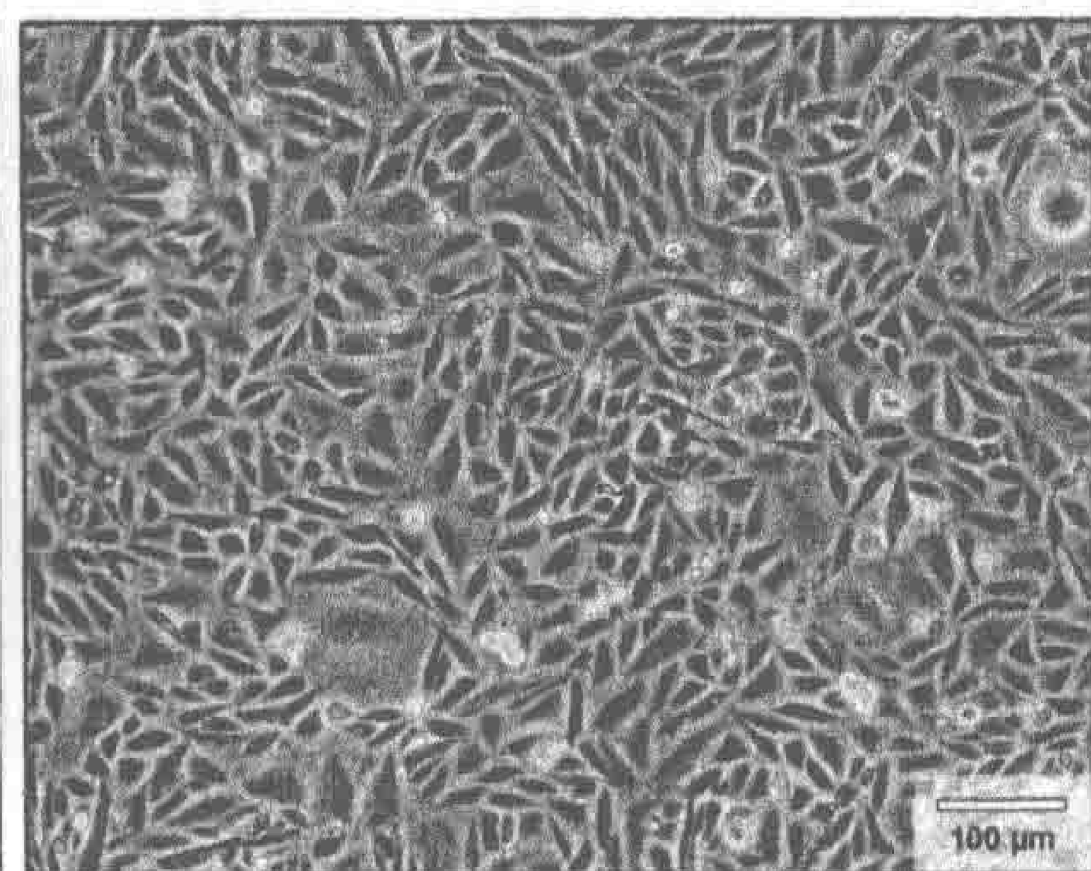
（a）BHK-21，亚汇合



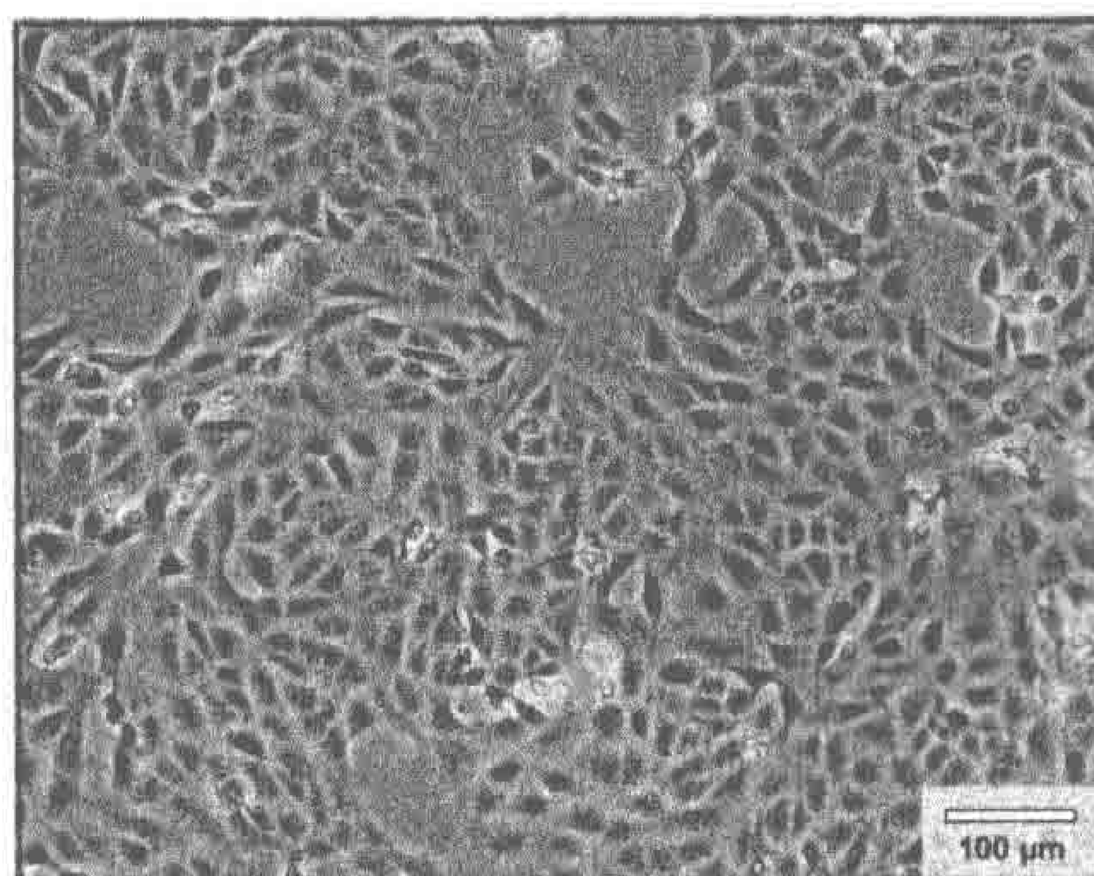
（b）BHK-21，汇合



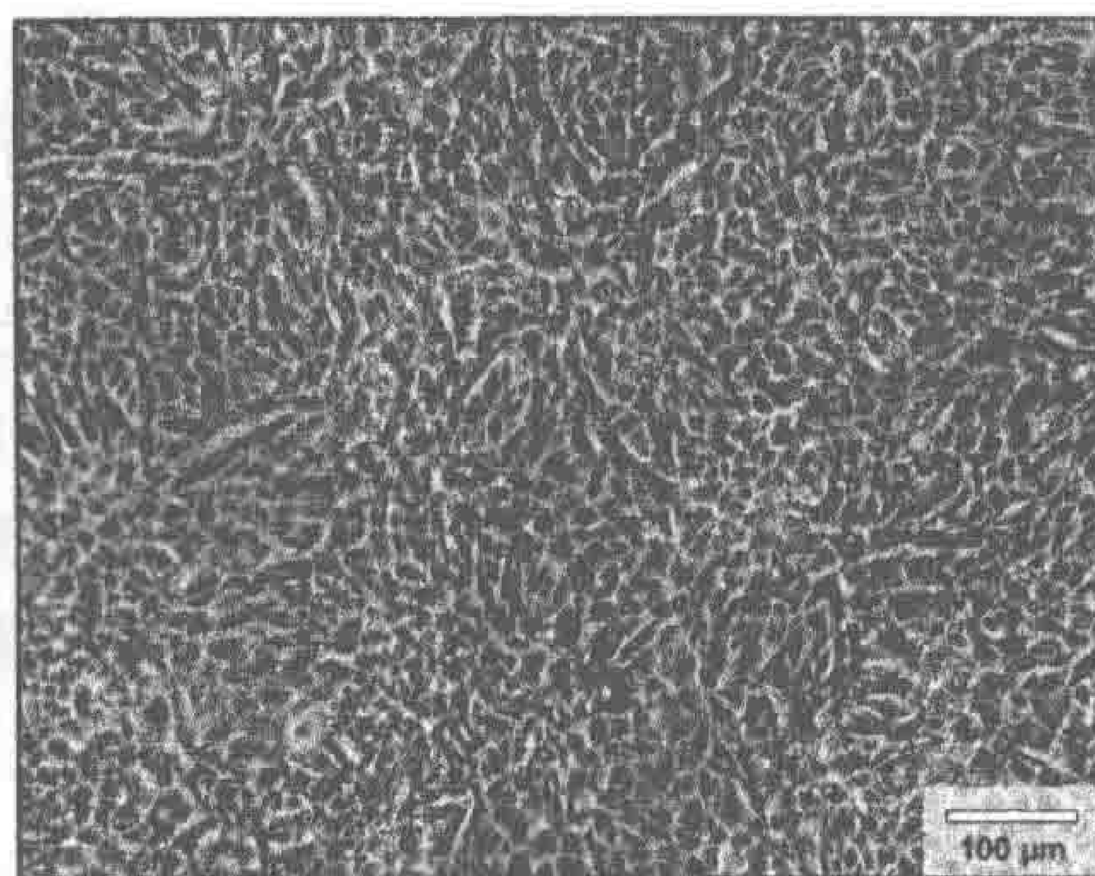
（c）CHO-K1，亚汇合



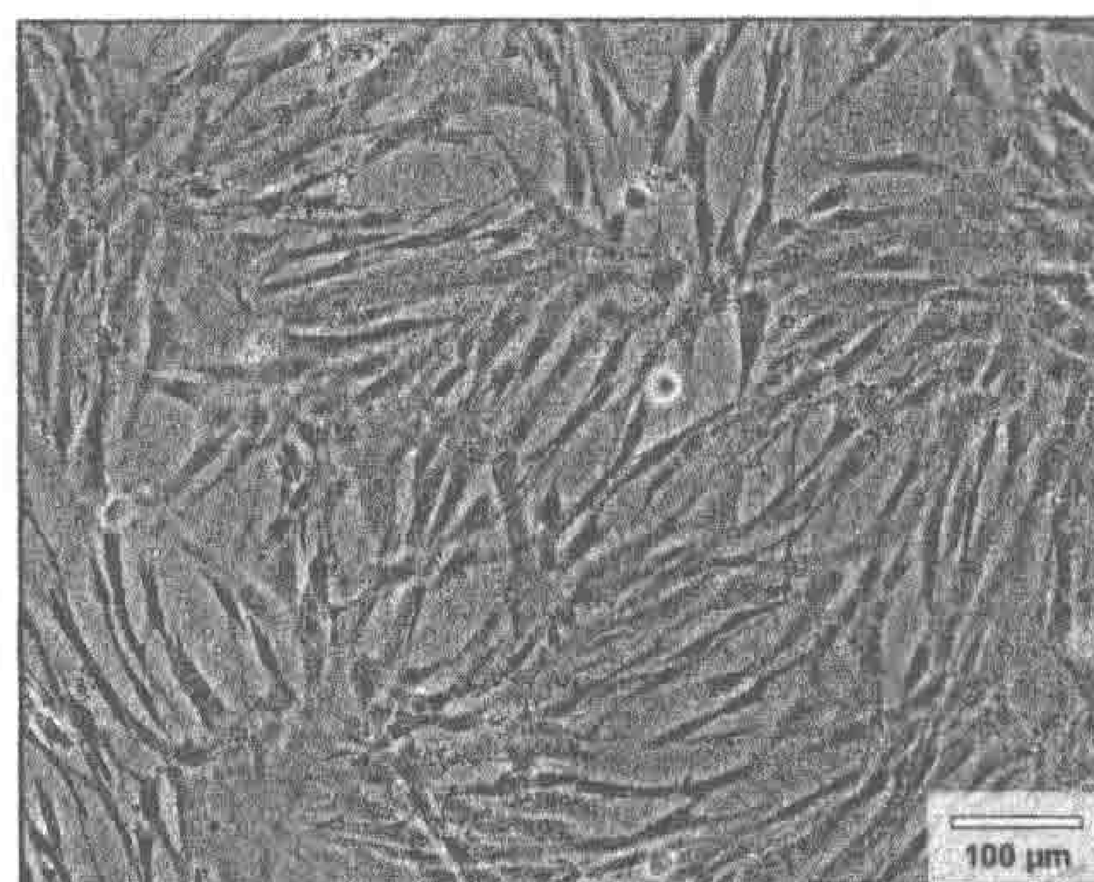
（d）CHO-K1，汇合



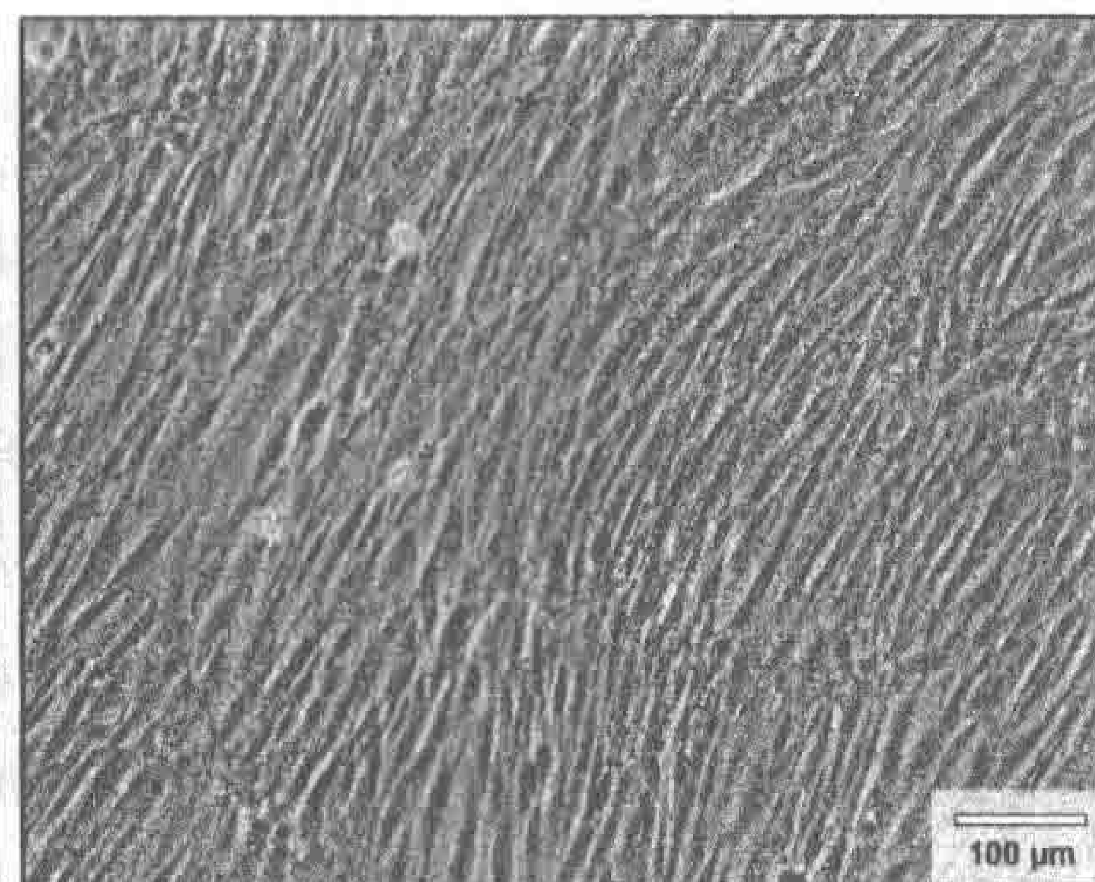
（e）Vero，亚汇合



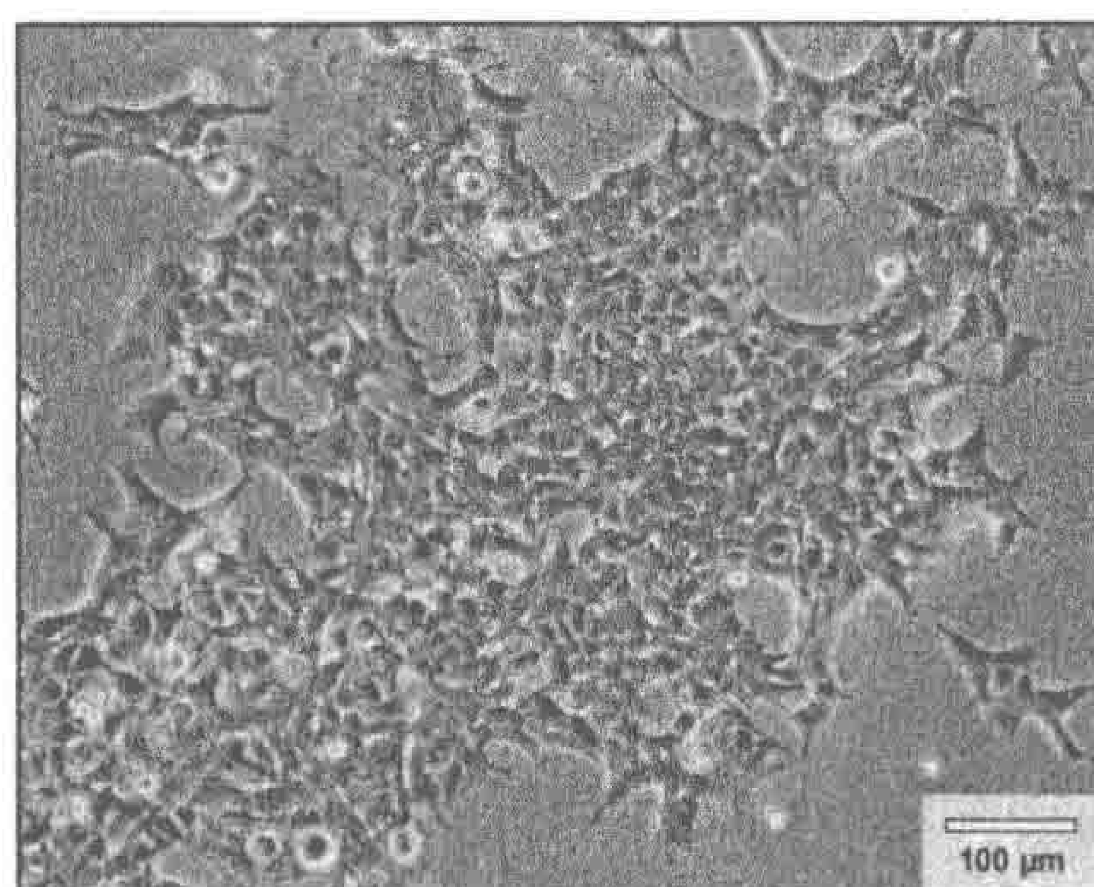
（f）Vero，汇合



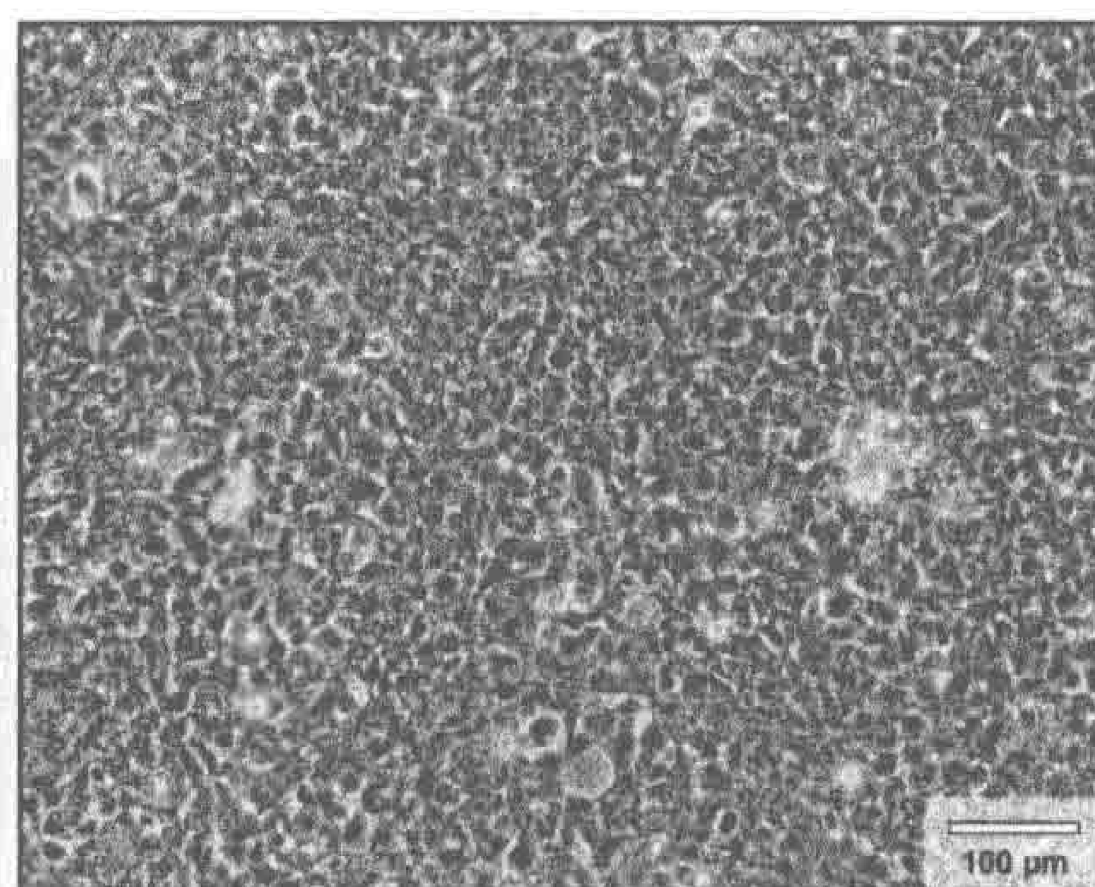
（g）MRC-5，亚汇合



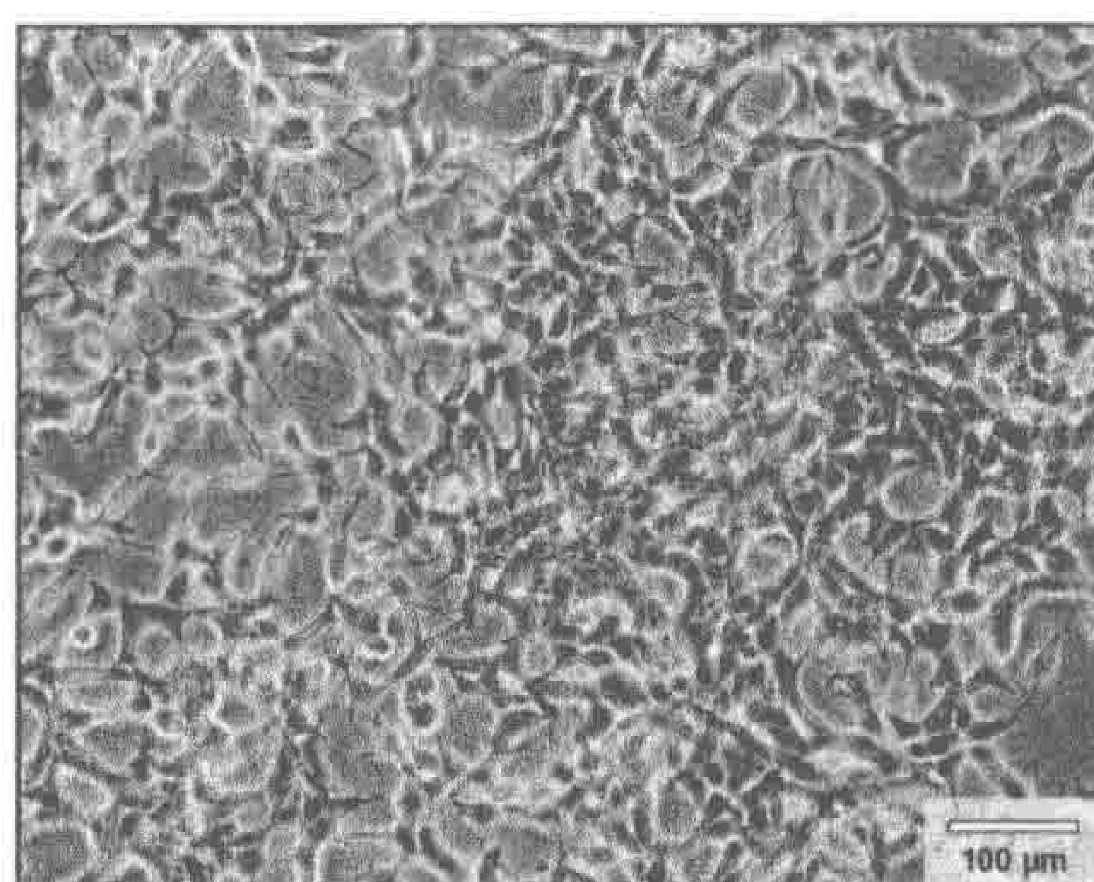
（h）MRC-5，汇合



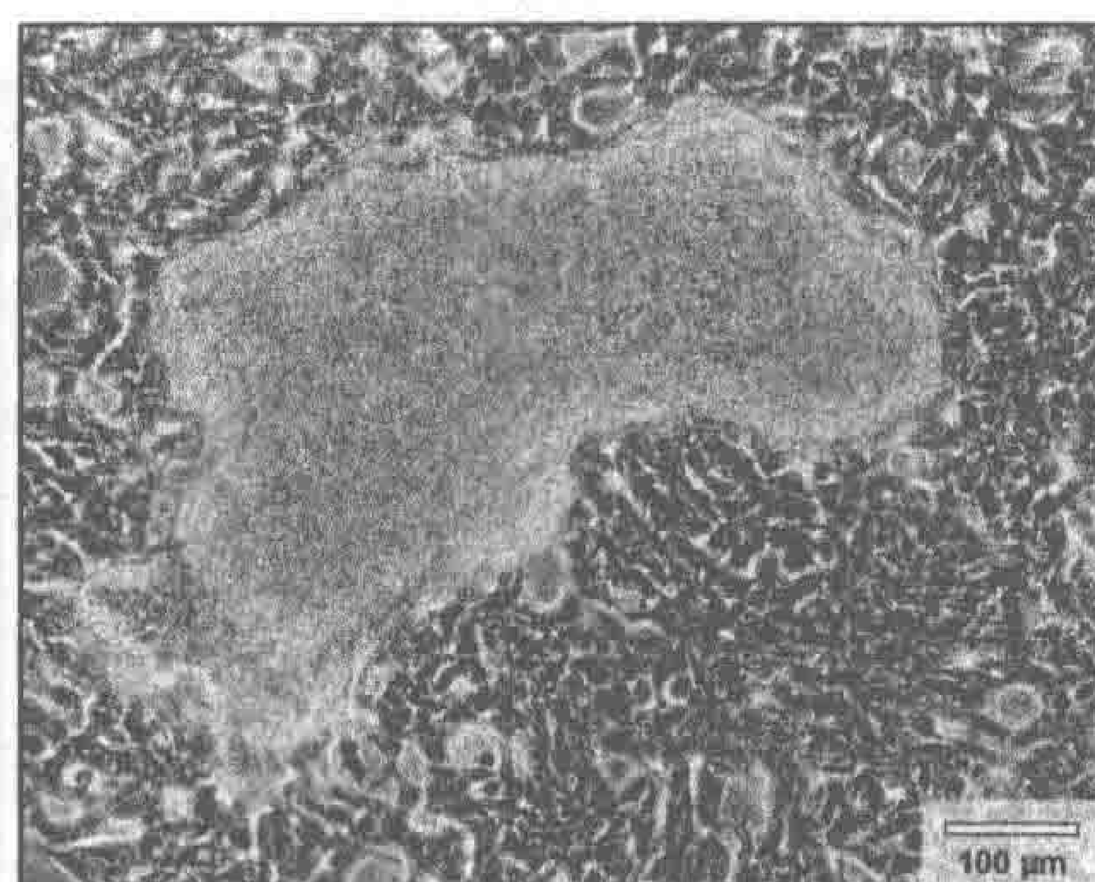
（i）HEK293，亚汇合



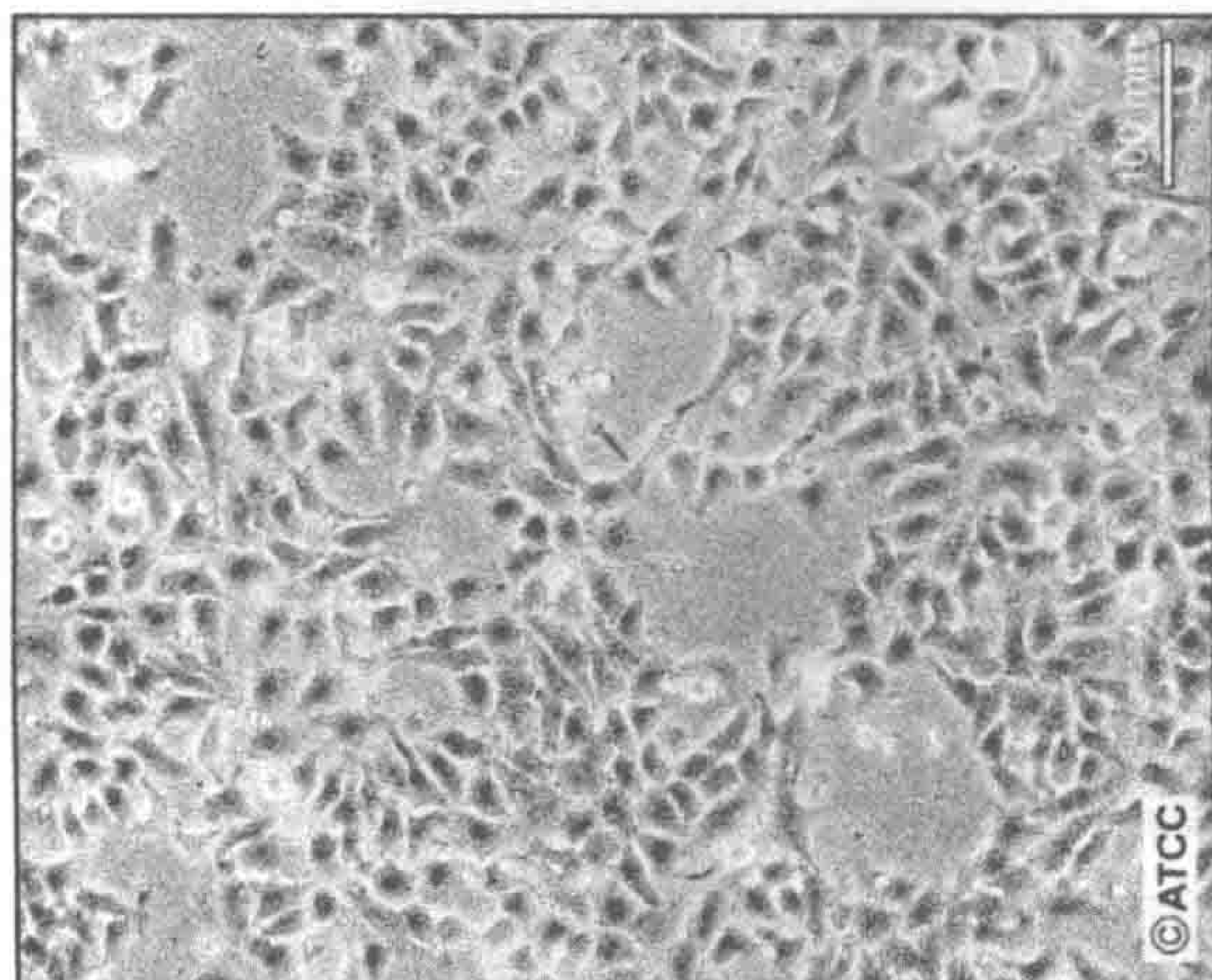
（j）HEK293，汇合



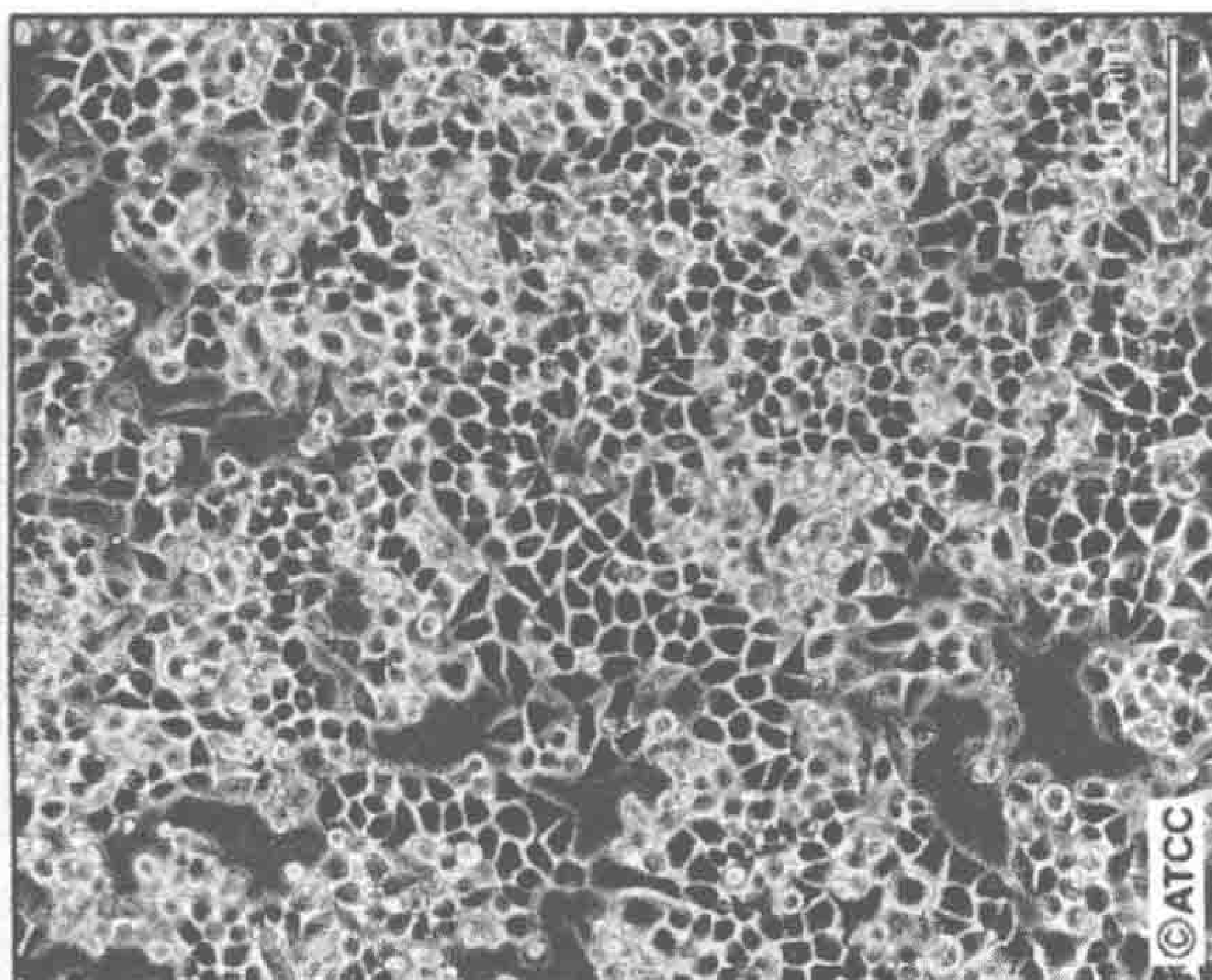
（k）LNCap，亚汇合



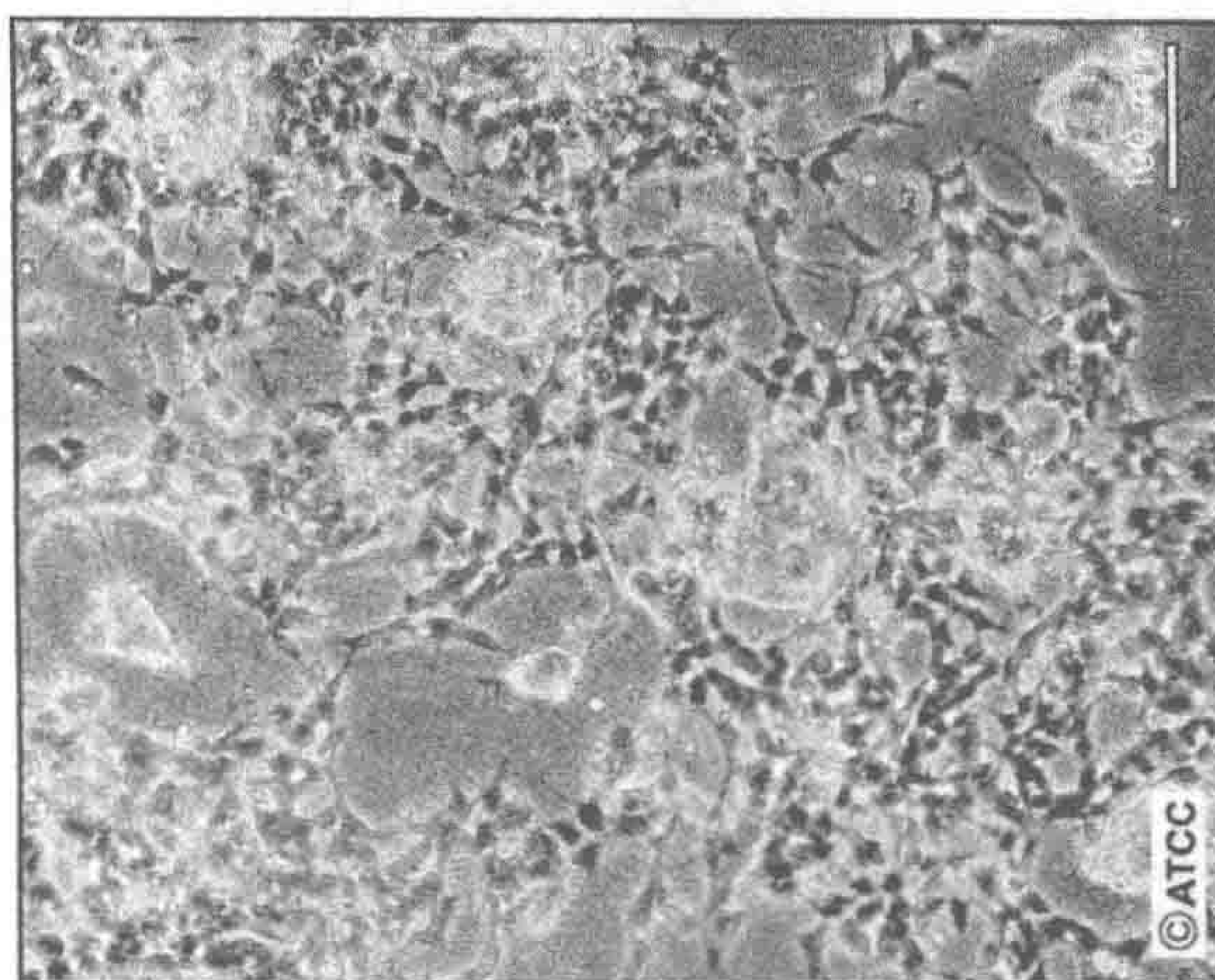
（l）LNCap，汇合



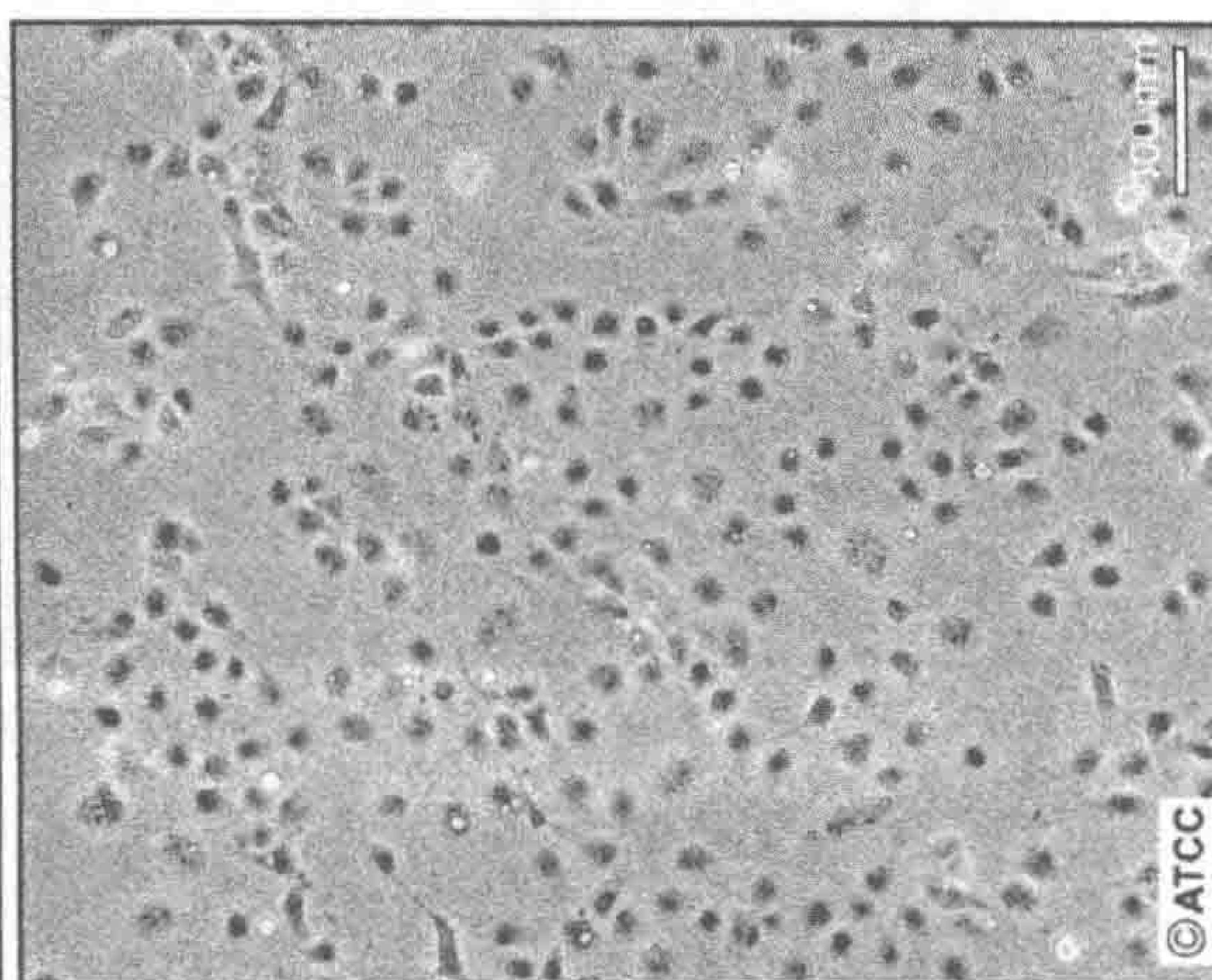
（m）HeLa



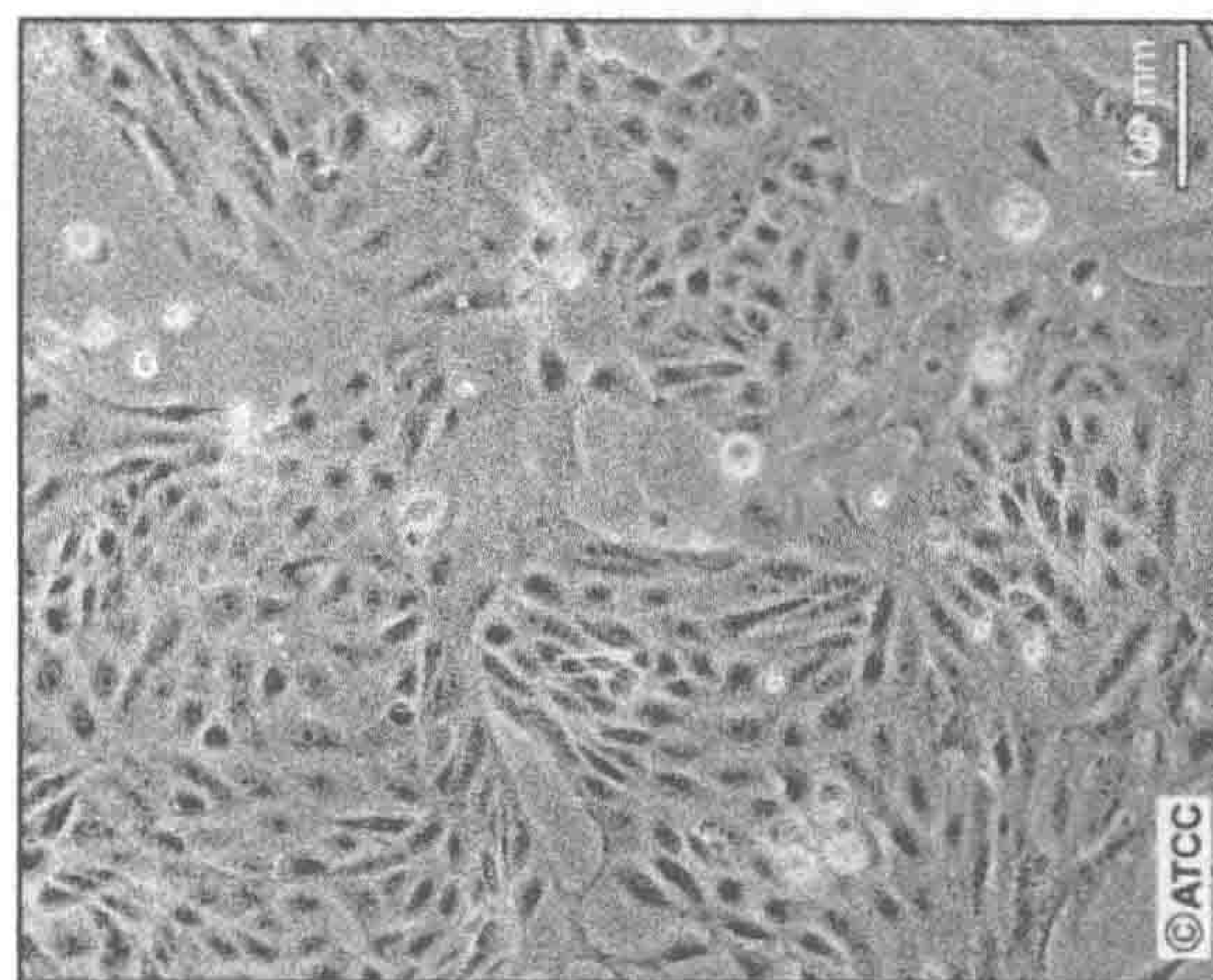
（n）HeLa-S_3



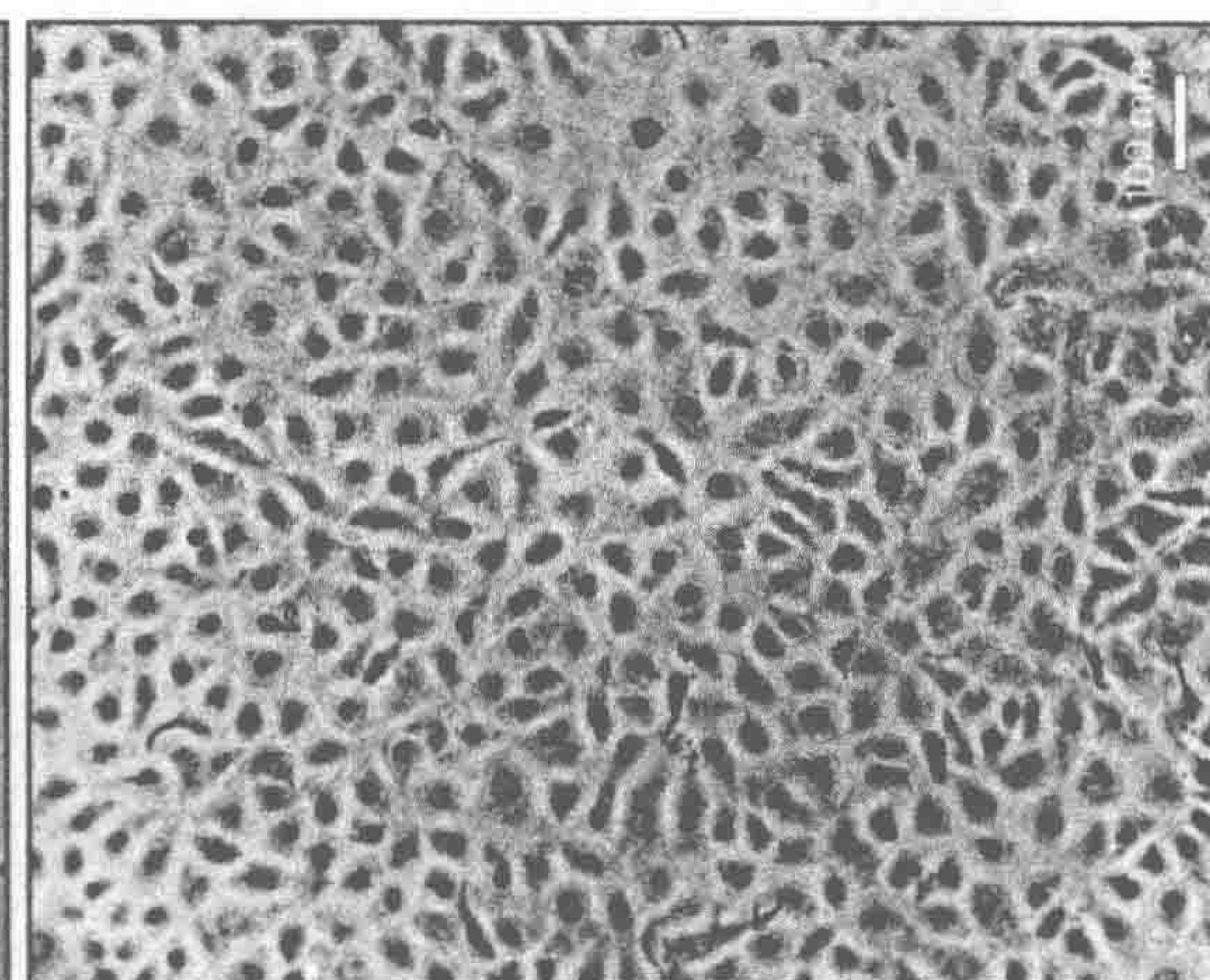
（o）IMR-32



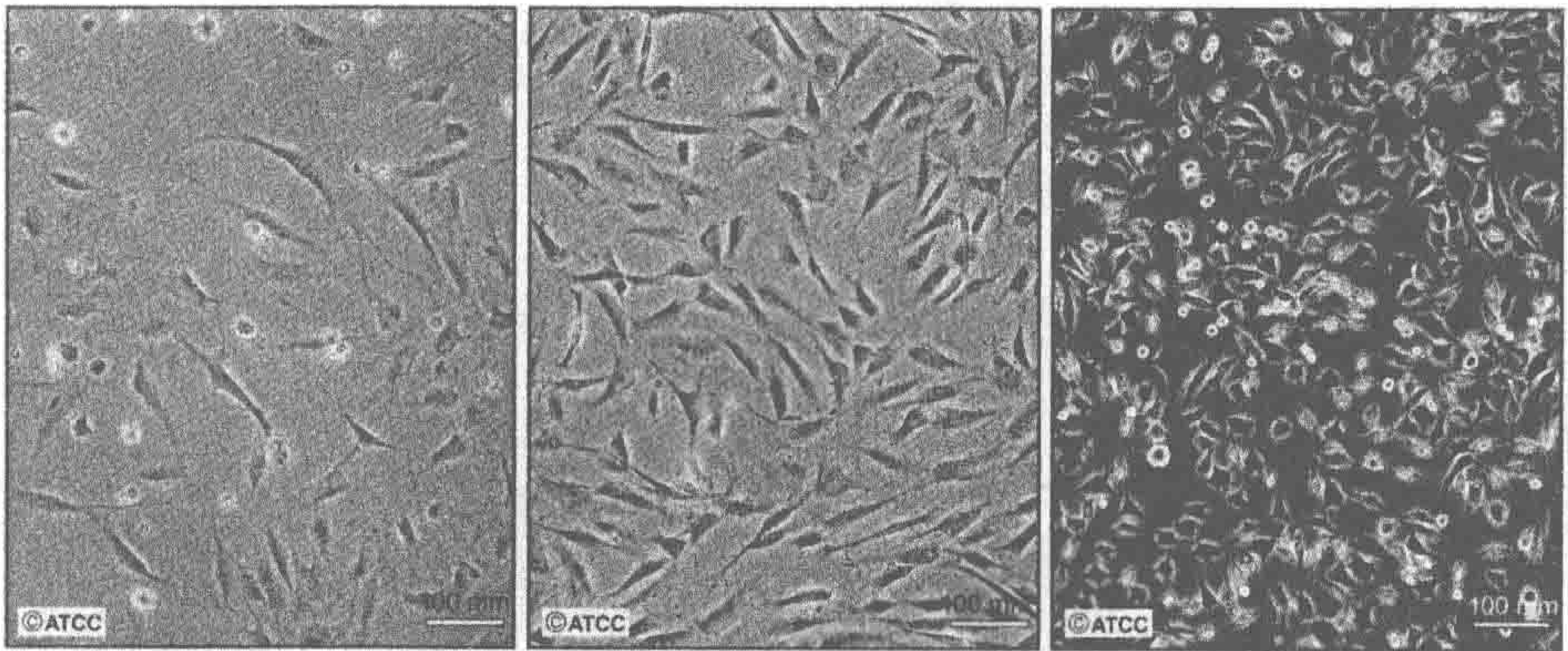
（p）Cos-7



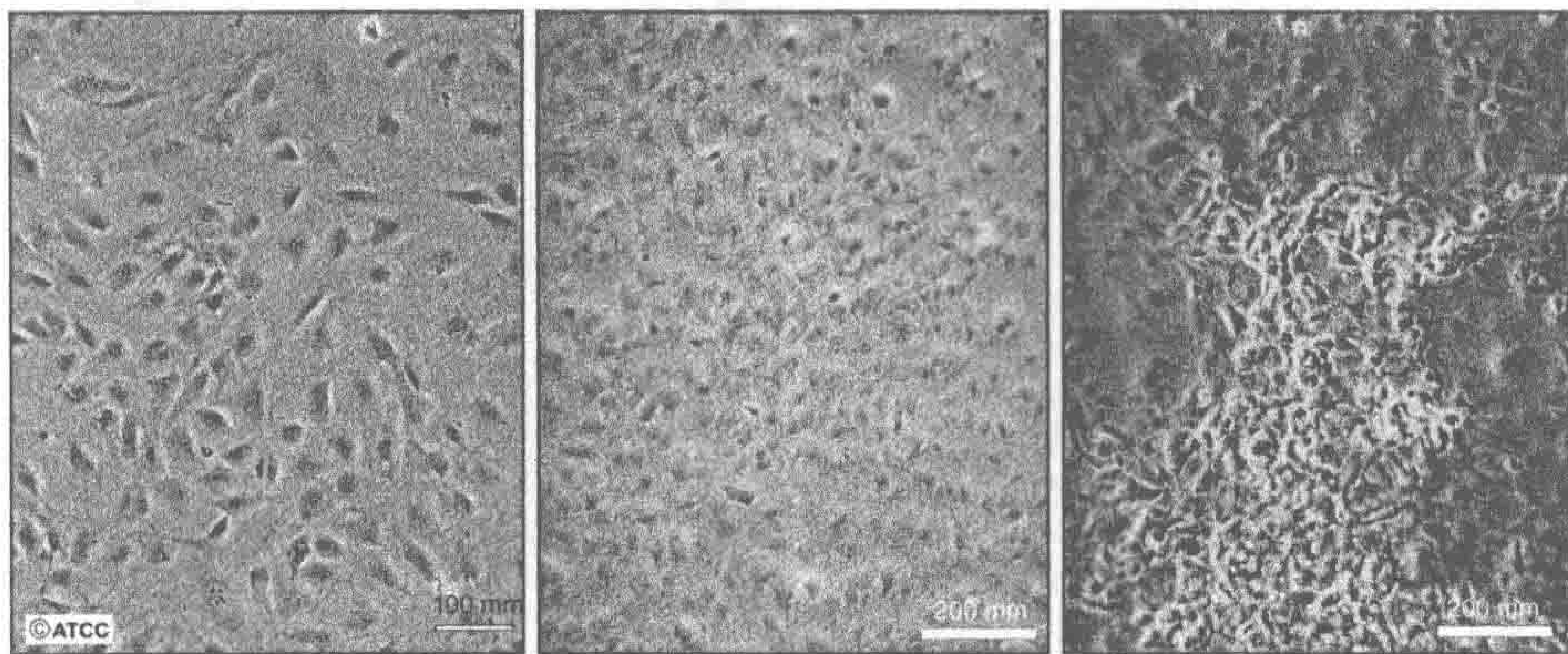
（q）MDCK



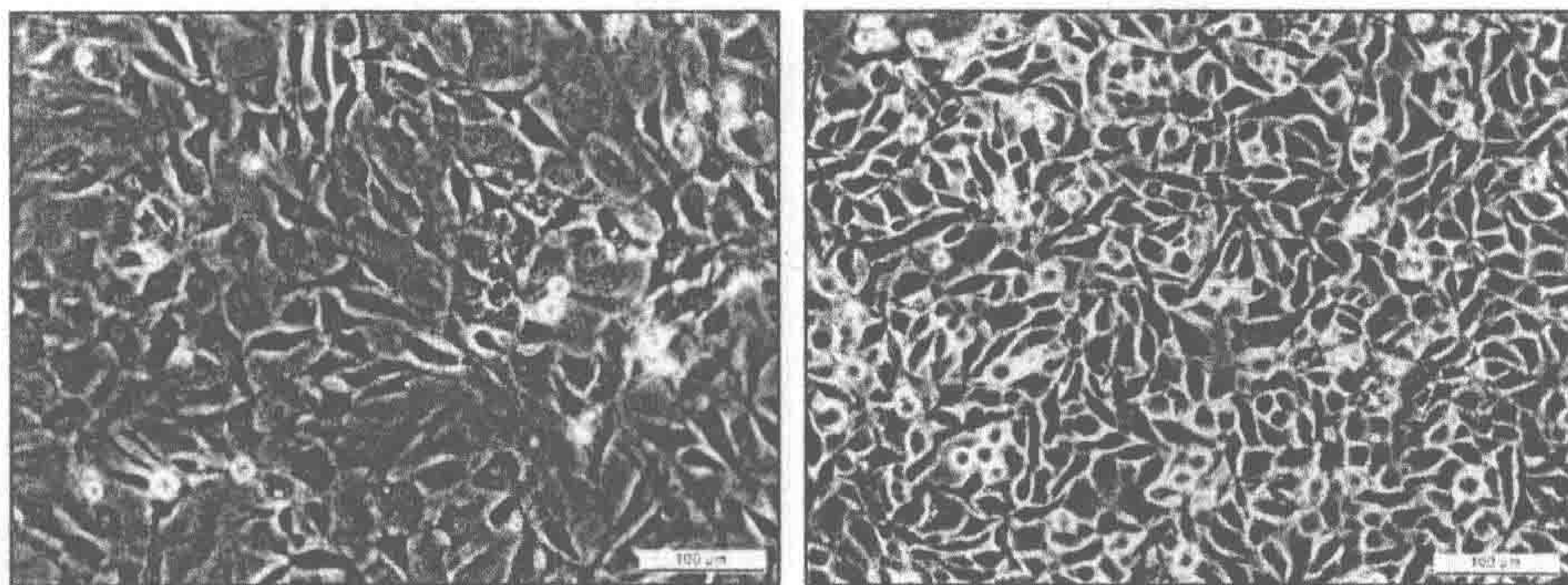
（r）BAE



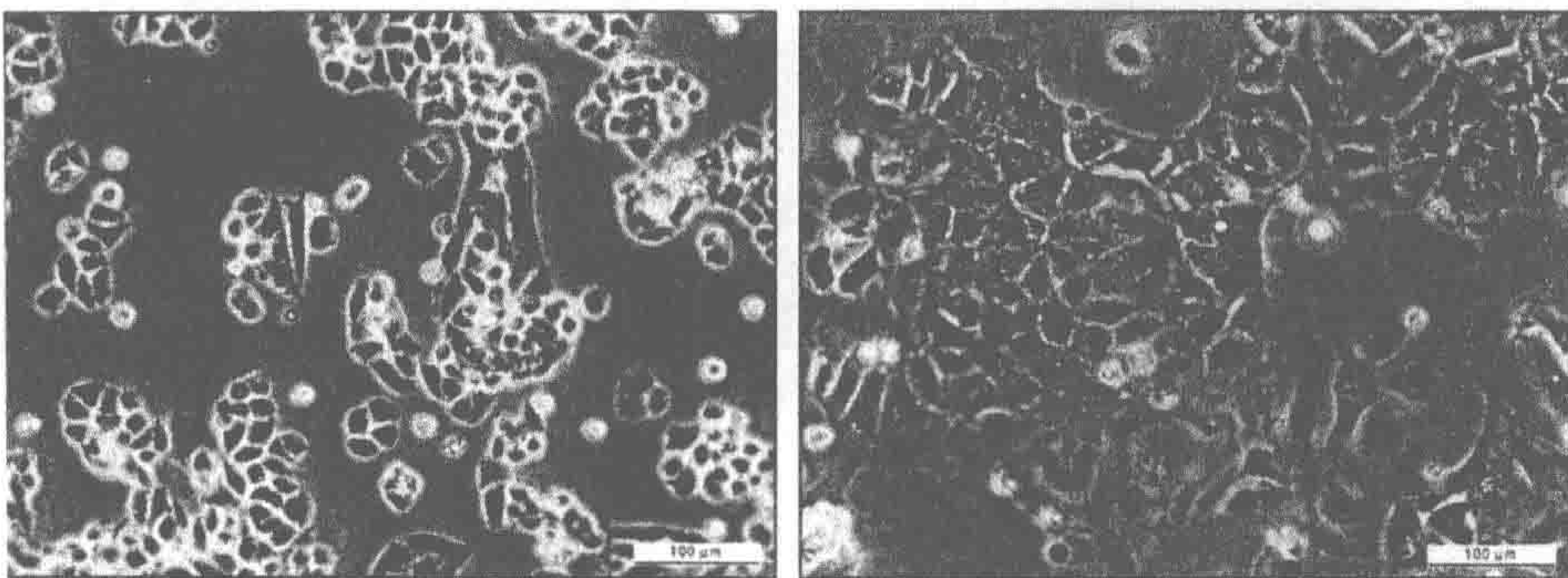
（s）Swiss 3T3，亚汇合　（t）NIH 3T3，亚汇合　（u）L-929，亚汇合



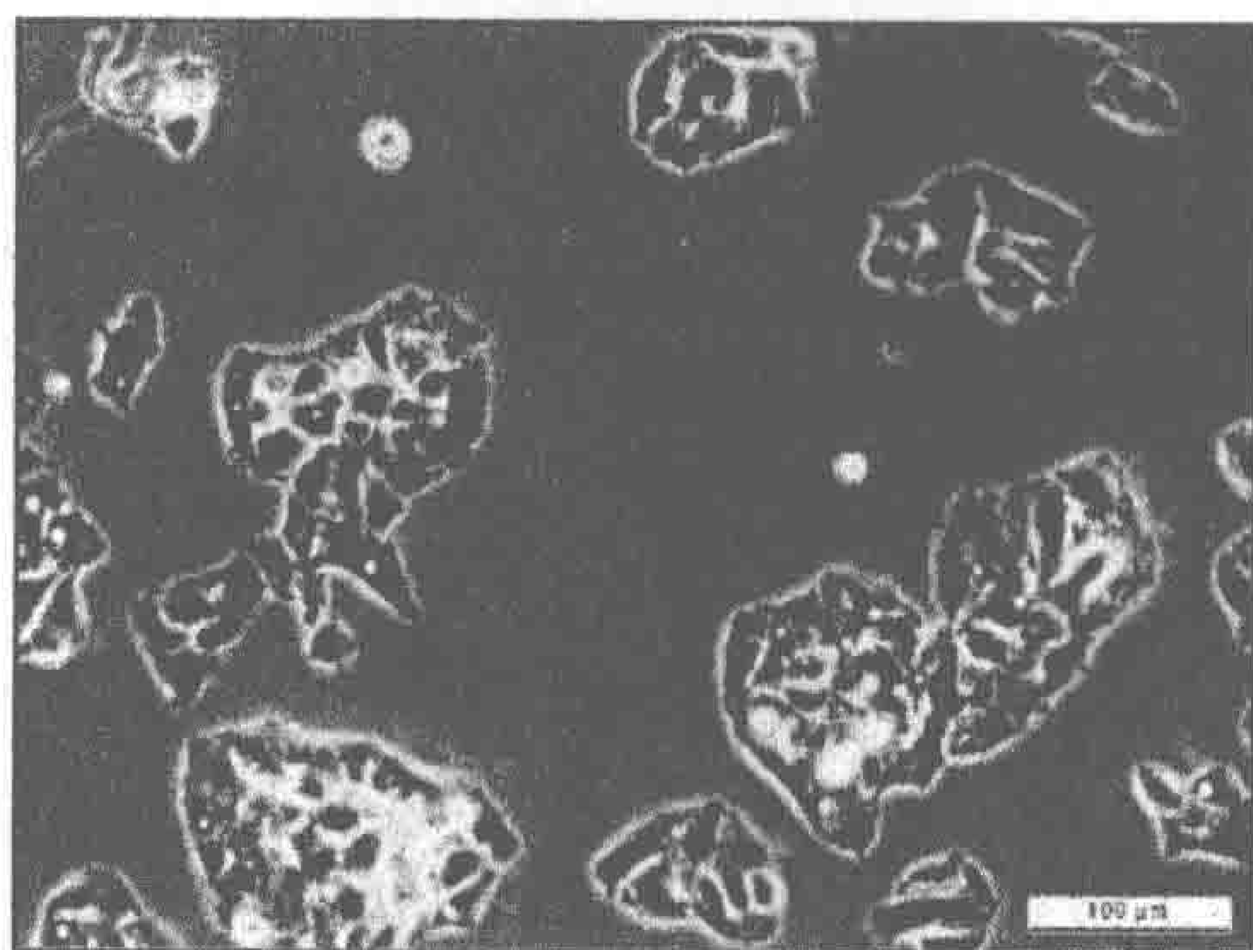
（v）Swiss 3T3，汇合　（w）Swiss 3T3，后汇合　（x）Swiss 3T3，转化



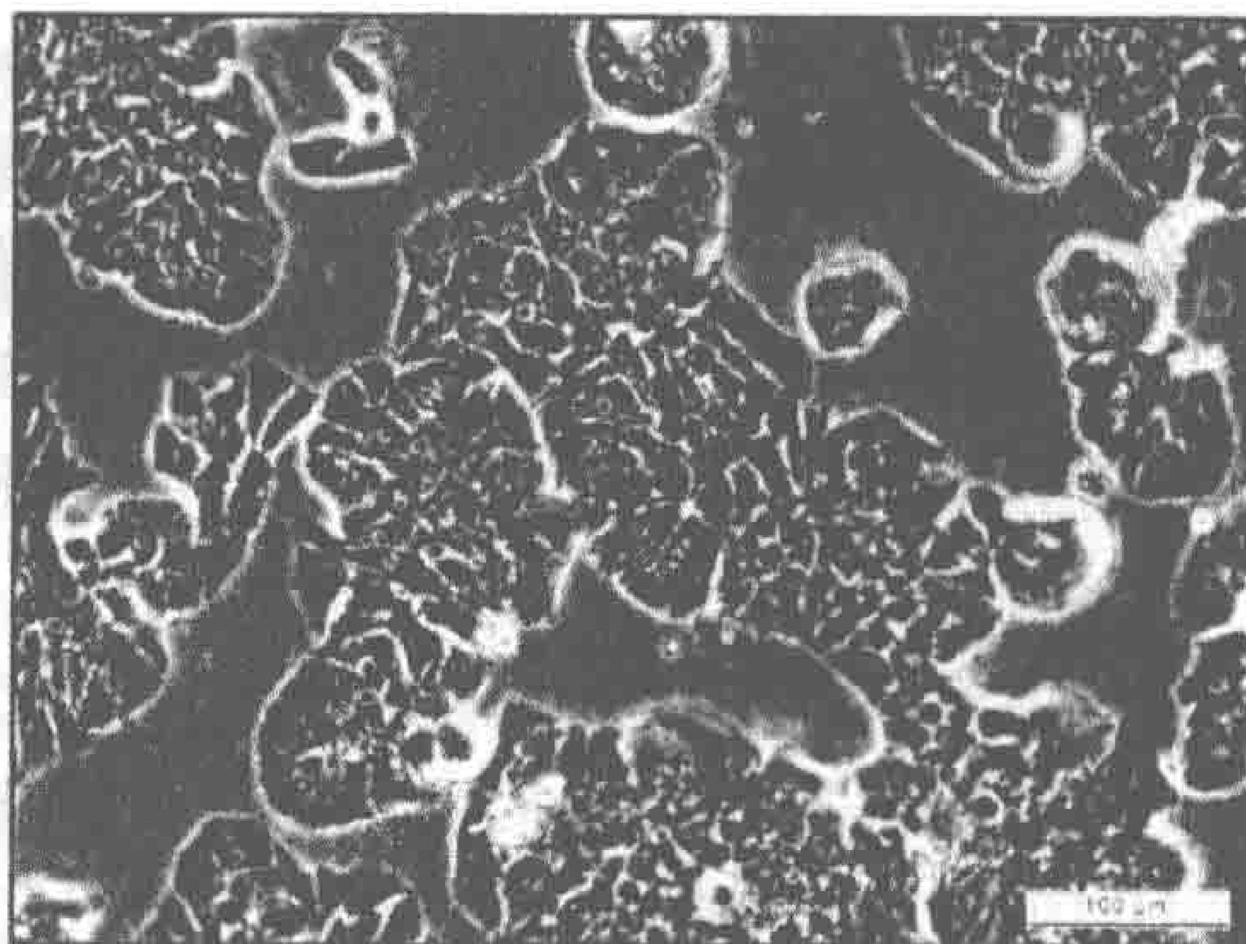
（y）STO，汇合　（z）EMT-6，汇合



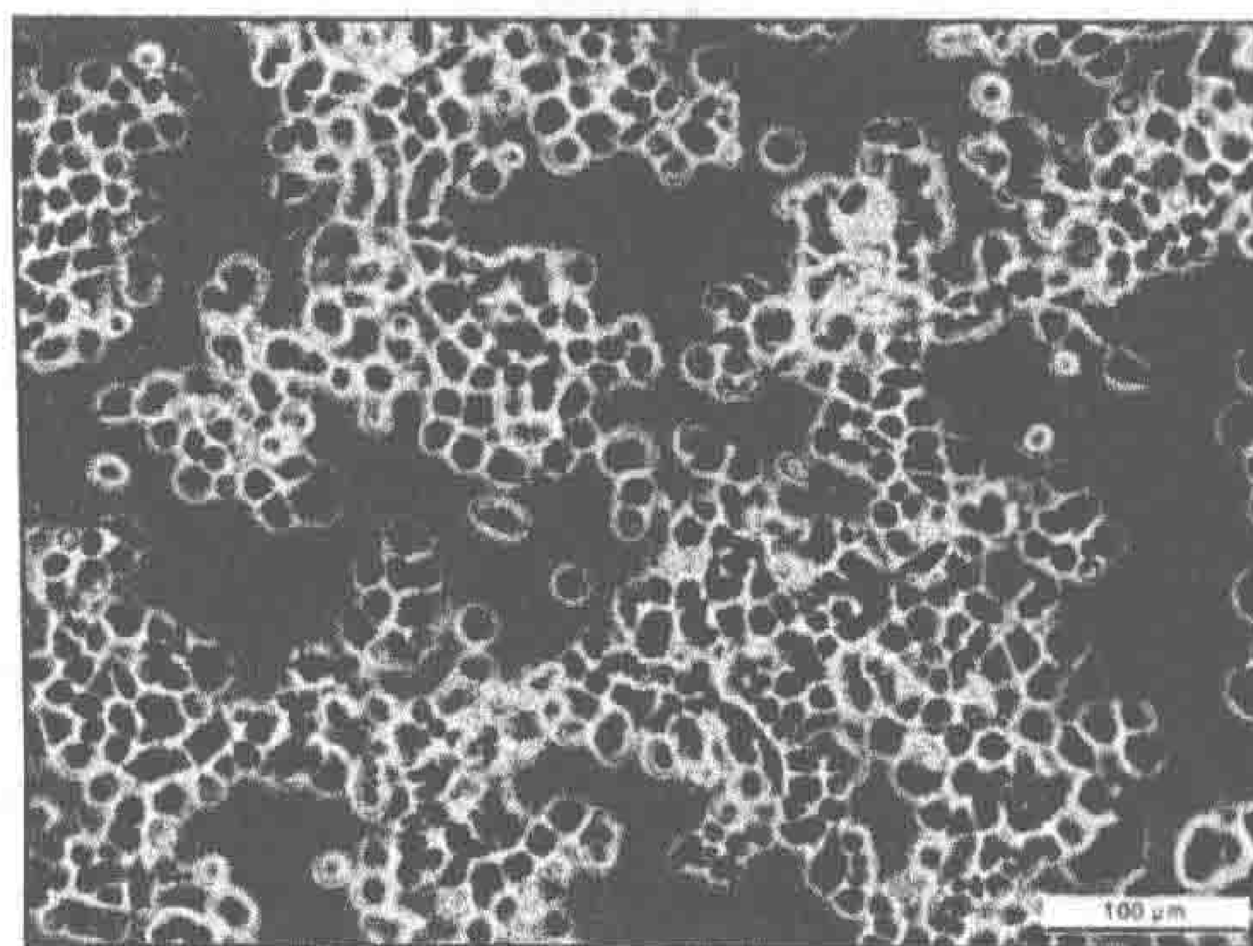
（aa）A2780　（bb）Caco-2



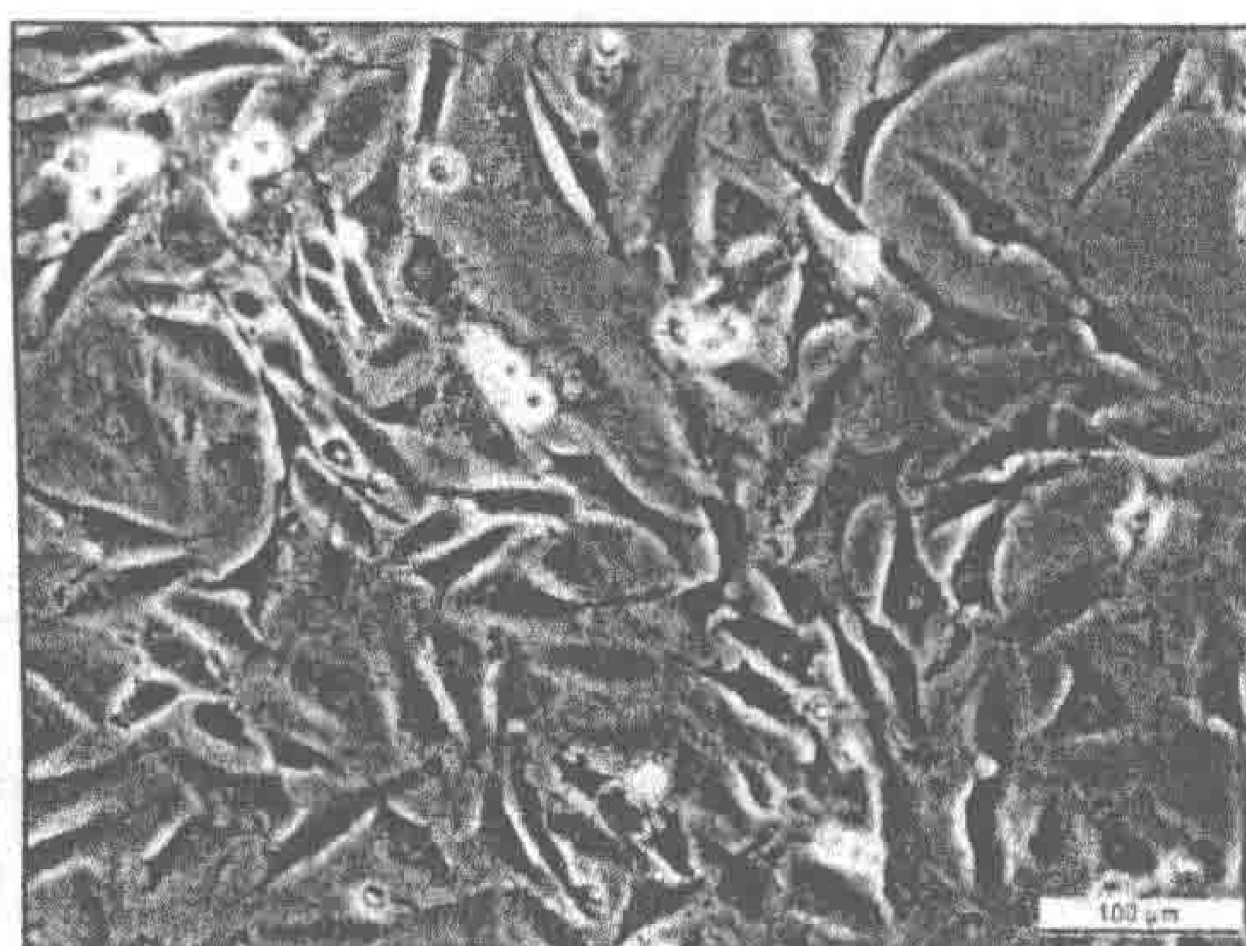
(cc) Hep-G2



(dd) HT-29



(ee) PC-12



(ff) U-373 MG

图 18.2 培养细胞形态举例。(a)对数生长期的 BHK-21(幼仓鼠成纤维细胞)。培养细胞尚未达到汇合，细胞铺展好，随机伸展(尽管已开始出现一些方向性);(b)对数生长期末的 BHK-21，正在进入平台期;(c)CHO-K1，中国仓鼠卵巢细胞的克隆化细胞系，有一些细胞呈成纤维样，其他更像上皮样;(d)高密度时 CHO-K1 细胞，折光，更多椭圆或上皮样的细胞，伴有少量梭形细胞;(e)对数生长期的 Vero 细胞，上皮样，成片;(f)高密度的 Vero 细胞群，过度汇合，致密片状，细胞直径较小;(g)低密度(对数中期)的 MRC-5 人胚胎肺成纤维细胞，随机生长，方向性开始出现;(h)汇合的 MRC-5 细胞，清楚显示平行排列;(i)HEK293 人胚胎肾上皮细胞，对数中期，片状生长;(j)高密度 HEK293 细胞，呈现致密排列的上皮细胞;(k)LNCaP 克隆 FGC 细胞，来自前列腺癌的淋巴结转移灶，中等到高密度;(l)高密度 LNCaP 细胞，形成聚集体;(m)HeLa 细胞，来自人宫颈癌;(n)来自 HeLa 的克隆 HeLa-S_3;(o)IMR-32 细胞，来自人神经母细胞瘤;(p)Cos-7 细胞，来自猴肾;(q)MDCK 细胞，Madin-Darby 狗肾细胞;(r)BAE 细胞，来自牛主动脉内皮;(s)亚汇合状态 Swiss 3T3 细胞(Sw-3T3)，来自 Swiss albino 小鼠胚胎;(t)NIH 3T3 细胞，来自 NIH 小鼠胚胎;(u)L-929，小鼠 L-细胞的克隆;(v)汇合状态的 Swiss 3T3，注意反差很低，表明细胞单层很薄;(w)过度汇合的 Swiss 3T3;(x)过度汇合的 Swiss 3T3 细胞，显示生长在单层上面的折光的转化灶，说明这些细胞为什么必须在汇合前传代;(y)汇合的 STO 小鼠胚胎成纤维细胞，常用作胚胎干细胞培养的滋养细胞;(z)汇合的 EMT-6 小鼠乳腺癌细胞系，容易形成球样体;(aa)亚汇合状态的 A2780，人卵巢癌;(bb)Caco-2，结直肠癌，用于跨上皮运输的研究;(cc)Hep-G2，人肝细胞瘤，有时用于代谢药物或潜在细胞毒素的研究;(dd)HT-29 结直肠癌，可用于丁酸钠的诱导分化;(ee)PC-12，大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤，NGF 可诱导神经元表型;(ff)U-373MG，人胶质瘤，瑞士 Uppsala 大学研制的一系列恶性和正常胶质细胞系之一(图 a~q，s~v 由 ATCC 馈赠;r，由 Peter Del Vecchio 馈赠;y，z，aa~ff 由 ECACC 馈赠;另见彩版 7~彩版 10、彩版 27、彩版 28)


彩版 7


彩版 8


彩版 9


彩版 10


彩版 27


彩版 28

见19.7.2节、19.7.3节）同样可以影响细胞的形态。因此，对比性地观察细胞应该在同一种培养基中，处于相同的细胞生长阶段和细胞密度，而且要生长在相同的基质上。

对活的培养物进行经常性的短暂观察，最好使用相差显微镜，这样比经过一定间隔才偶然进行的染色制片的观察更有价值。显微镜观察提供了一个关于细胞形态和可塑性的总体印象，同时也可发现代表培养物健康状态的颗粒与空泡的变化，不健康的细胞常常呈颗粒状，在核周有空泡（参见图12.1）。

对每一种细胞系保存一套不同密度（图18.2）的照片很有用（参见方案18.5）。得到细胞后立即拍照，并随后进行间隔性拍照，以后一旦怀疑有形态学的变化即可作为记录。常用细胞的相差显微镜图片应在相差显微镜上方展示。这项记录中也可补充染色后的图像资料和DNA谱的数字输出，作为细胞系记录保存在数据库中，或单独保存，与细胞系数据关联。

许多细胞系的照片在网络上可以找到（如ATCC、ECACC）。一本细胞系的图集也已经由Lindl和Steubing（2013）出版。

18.4.1 显微镜

倒置显微镜是组织培养实验中最重要的工具之一，但经常使用不当（方案18.1）。由于封闭培养器皿的厚度造成工作距离太长，从上面观察困难，所以培养器皿被放在载物台上，从上面照明、下面观察。由于培养器皿壁的厚度还限制成像工作距离，最大的物镜放大倍数只有40倍。使用相差镜头，环形光路由相应的暗环遮挡，只有衍射的光可看见，可在高反差下观察没有染色的细胞，常规照明是达不到的。因为光照强度增加了，所以光路中需加红外滤光片，以便长时间观察细胞。

方案18.1 倒置显微镜的使用

概要

将培养物放在显微镜的载物台上，打开电源，选择合适的镜头，聚焦于标本，如果必要的话，将聚光器和相差环调节在中心。

材料

非无菌

- 倒置显微镜（参见4.2.4节），配有相差10×、20×、40×的物镜及聚光镜和合适的相差环
- 擦镜纸

操作步骤

1. 确保显微镜清洁（用70%乙醇擦拭载物台。如果有必要，用擦镜纸清洁物镜）。
2. 在显微镜前找个舒适的位置：

   (a) 设定座椅在合适的高度及离工作台适当的距离，这样你的眼睛与目镜在同一水平，无需拉伸。这一位置不是所有的使用者都是一致的，所以需要调节座椅；

   (b) 定位自己，让前臂支撑你的体重，手空出来调节焦距；

   (c) 调节目镜与你的眼睛在合适的距离。

3. 打开电源，将灯光强度从最低开始调至合适的强度，而不是直接打到强光。

4. 通过设定柯勒照明检查光源与聚光镜的衔接：

(a) 移开原来选定的相差聚光镜；

(b) 将一张染色切片、培养瓶或培养皿放在载物台上；

(c) 关闭视场光圈；

(d) 聚焦在可变光阑上；

(e) 将可变光阑成像调整到视野的中央。

5. 将相差环调至中央：

(a) 重新选定合适的相差聚光镜；

(b) 如果显微镜配有相差望远镜，将之插入标准目镜位置，然后聚焦于相差环，检查聚光镜环（黑色背景中的白环）是否与物镜环（白色背景中的黑环）同轴；

(c) 如果没有相差望远镜，则将染色的标本换为没有染色的培养物（活的或固定的培养物），重新聚焦，调整相差环，直到获得最优对比。

6. 检查细胞（参见表 12.3）。10×相差物镜作为常规观察已足够，4×相差物镜不能提供足够的细节资料，但通常可以用来确定（总体生长）模式和选择观察区域。高于 10×的放大倍数则限制了观察区域，但可以在发现某个特别感兴趣的细胞时使用。

(a) 注意生长阶段（如稀疏、亚汇合、汇合、致密）。

(b) 记录细胞状态（如清亮、透明或有颗粒、有空泡等）。


彩版 16

7. 检查培养基的清亮程度（如无碎片、漂浮的颗粒、污染迹象等）（见 14.3.1 节，图 14.2a、c、e，彩版 16a~c），根据需要选择一个放大倍数更高的物镜。

8. 记录观察的结果。

9. 旋低变阻器（把灯光调暗），关掉电源。

10. 将培养物放回孵箱，或放在超净台上进行无菌操作。

如果直接从孵箱中取出培养物，在培养瓶或培养皿壁内面或盖子上会形成冷凝雾。这种冷凝雾可通过倒置培养瓶，让培养基从顶部流过（不能让培养基接近瓶颈）而清除，然后将培养瓶直立 10~20s，让液体流下。培养皿清除冷凝雾比较困难，可能需要在无菌条件下替换盖子。在更换盖子之前，确保培养皿正确标记，即在皿底一侧做标记，避免培养物无法识别。微量滴定板里的培养物特别难观察，因为孔内培养基的弯月液面有衍射。

18.4.2 染色

多嗜色性的血涂片染色方法，如 Giemsa 染色，为培养物染色的一种便利方法（方案 18.2）。进行血涂片染色时，Giemsa 染色常与 May-Grünwald 染液结合使用。单独使用时，Giemsa 染色将核染为粉红色或紫罗兰色，核仁呈蓝黑色，细胞质浅灰蓝色。所染细胞必须经过乙醇或甲醛固定，制备过程中必须彻底脱水，否则不能正常染色。

方案 18.2 Giemsa 染色

概要

培养物用甲醇固定，直接用未稀释的 Giemsa 染液进行染色，然后 1∶5 稀释染液，清洗培养物，在

潮湿状态下观察。

材料

非无菌

- D-PBSA
- D-PBSA：甲醇，1∶1
- 甲醇
- 未稀释的 Giemsa 染液
- 去离子水

操作步骤

本程序假定用于单层细胞的染色，但固定的悬浮细胞（参见 18.4.4 节）也可以使用，从步骤 6 开始。

1．移除培养基。

2．用 D-PBSA 冲洗单层细胞，去掉冲洗液。

3．加 D-PBSA/甲醇液 5mL/25cm^2，静置 2min，然后去掉 D-PBSA/甲醇液。

4．加新甲醇 5mL，静置 10min。

5．弃掉甲醇液，用无水甲醇冲洗单层细胞，去掉甲醇。

6．此时，培养瓶经干燥可储存，也可直接进行染色。用新无水甲醇冲洗后直接染色是非常重要的，即使是干的培养瓶。如果甲醇倒出，培养瓶静置了一段时间后，残留的甲醇会吸收水分，从而妨碍下一步的染色，即使是干燥的单层细胞也可从空气中吸收水分。

7．加入纯的 Giemsa 染液，2mL/25cm^2，确保覆盖整层细胞。

8．2min 后，用 8mL 水稀释染液，并轻轻晃动 2min。

9．用水置换染液，让（染液）形成的浮渣流走，而不会留下来覆盖在细胞上，用自来水冲洗细胞，直到去除片状粉色本底（沉积），但不能漂掉细胞的染色（通常 10~20s）。

10．将水倒出，用去离子水冲洗，在单层细胞仍处于湿润状态时，用显微镜观察细胞，干燥保存细胞，再观察时重新湿润。

注意事项 Giemsa 染色步骤简单，可提供对比强烈的多色性的染色，但沉淀出的染料使细胞看起来呈斑点状。由于氧化原因，在染液表面形成沉淀，当加入水时，在整个溶液中，特别是在载玻片的表面上形成浮渣，冲洗染液时通过向上提升液面，而不是倒出液体或取出载玻片，在最后步骤，为防止细胞和浮渣接触，彻底冲洗以便去掉留在染色片上的浮渣。

固定的细胞同样可以用结晶紫染色，它是一种单色的染液，可使核呈蓝黑色，细胞质呈浅蓝色。它不如用 Giemsa 染色进行形态学观察的效果好，但使用方便且可重复使用，对于计数染色的克隆细胞是一种方便的染色方法，不会像 Giemsa 染色那样产生浮渣沉积问题，而且易冲洗，背景清晰，易于进行自动克隆计数（方案 18.3）。

方案 18.3 结晶紫染色

概要

用甲醇固定培养物，直接用结晶紫染色，冲洗培养物，观察。

材料

非无菌

- D-PBSA
- D-PBSA/甲醇（1∶1）
- 甲醇
- 0.1%（*w/V*）结晶紫
- 过滤漏斗和滤纸，大小要适合于每个培养皿中盛载 5mL 的染液
- 回收染液的瓶子

操作步骤

1. 吸出并弃掉培养基。
2. 用 D-PBSA 冲洗单层细胞，弃掉冲洗液。
3. 每 $25cm^2$ 加入 D-PBSA/甲醇 5mL，静置 2min，弃掉 D-PBSA/甲醇。
4. 加入新甲醇 5mL，静置 10min。
5. 弃掉甲醇，将培养皿倒干净，使其干燥。
6. 每 $25cm^2$ 加入 5mL 结晶紫，静置 10min。
7. 过滤漏斗放置在瓶上。
8. 将染液倒入漏斗。
9. 用自来水冲洗培养皿，然后用去离子水冲洗，干燥培养皿。

18.4.3 细胞学检查所用培养器皿：单层培养

以下是已证明适合于细胞学的培养器皿。

（1）常规 $25cm^2$ 培养瓶：在高倍观察时可能需要去除顶部，已有可移除顶部的培养瓶（TPP）。

（2）培养皿：3.5cm 和 5cm。

（3）盖玻片（玻璃或塑料，见补充材料中的附录III）：置于多孔培养板或培养皿中。

（4）显微镜载玻片：置于 9cm 培养皿中。

（5）显微镜载玻片：玻璃或塑料的，配有单孔或多孔培养小室（Fisher Scientific；另见补充材料中的附录III：培养小室载玻片；图 18.3a、b）。

（6）OptiCell 的双膜培养小室（Fisher Scientific；USA Scientific；图 18.3c）。

（7）多孔板插入式滤膜小室：带有乙酯纤维素或聚碳酸酯的膜（见 20.3.9 节）。

（8）Thermanox 包被的盖玻片（Thermo Scientific）。

（9）配有底部盖玻片的培养皿（MetTek）。

后面 3 种培养器皿都可用于电镜细胞学的研究（膜或 PTFE 需要某些预处理，如明胶、胶原、纤连蛋白、Matrigel 或血清包被，见 7.2.1 节）。也还有很多用于活细胞成像及显微镜延时摄影技术的灌注小室。

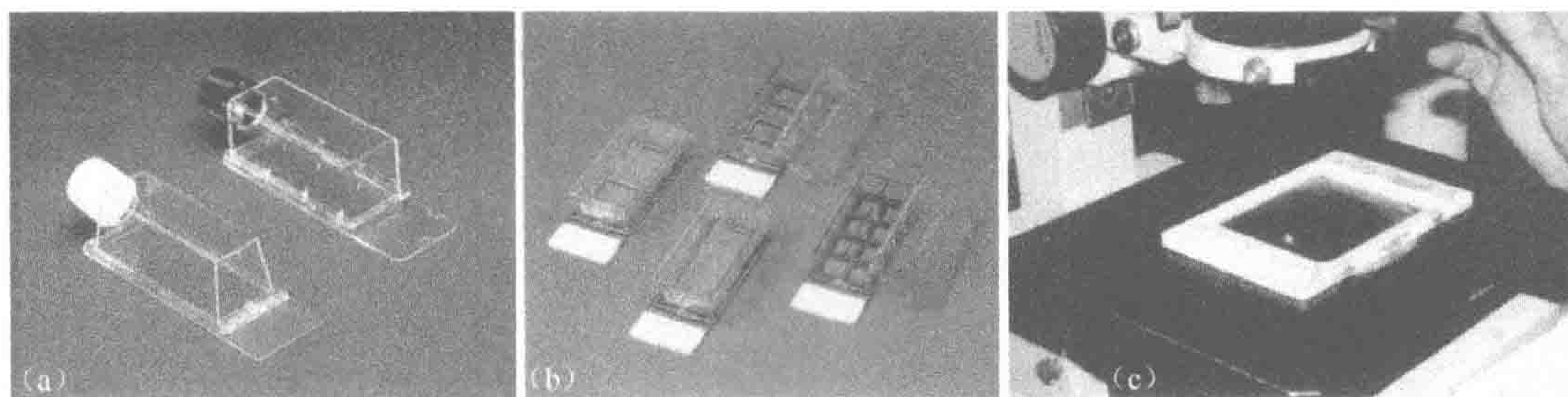


图 18.3 为细胞学观察而设计的培养装置。（a）Nunc 载玻片培养瓶（Thermo Fisher），后续处理时瓶可以揭掉；（b）Lab-Tek 小室玻片（Thermo Fisher-Nunc），常规载玻片上有可揭掉的塑料小室，每张载玻片有 1、2、4、8 和 16 个小室的规格可供选择；（c）Opticell 培养小室（Thermo Fisher），有上、下适于细胞生长和观察的塑料膜（a、b 由 Nunc 惠赠；c 由 Donna Peehl 博士惠赠）

18.4.4 悬浮细胞细胞学检查的标本制备

非贴壁细胞必须沉淀在玻璃或塑料的表面才能进行细胞学观察。常规用于血液细胞的方法是制备血涂片，对培养的细胞不太好用，因为铺片时培养细胞会破裂。用血清包被，然后在血清中推片可减少破裂。

离心 细胞学离心机已成为制备单层悬浮细胞的首选。离心机（通常称为细胞甩片机）配备多个特殊的持片架，可以将旋转的细胞甩到玻片上（参见补充材料中的附录Ⅲ：细胞离心机；图 18.4）。持片架上有样品室，面对着玻片，有开口，持片架位于专门设计的封闭的转子内。用血清包被玻片有助于防止细胞撞击破片时造成的破碎，详见方案 18.4。

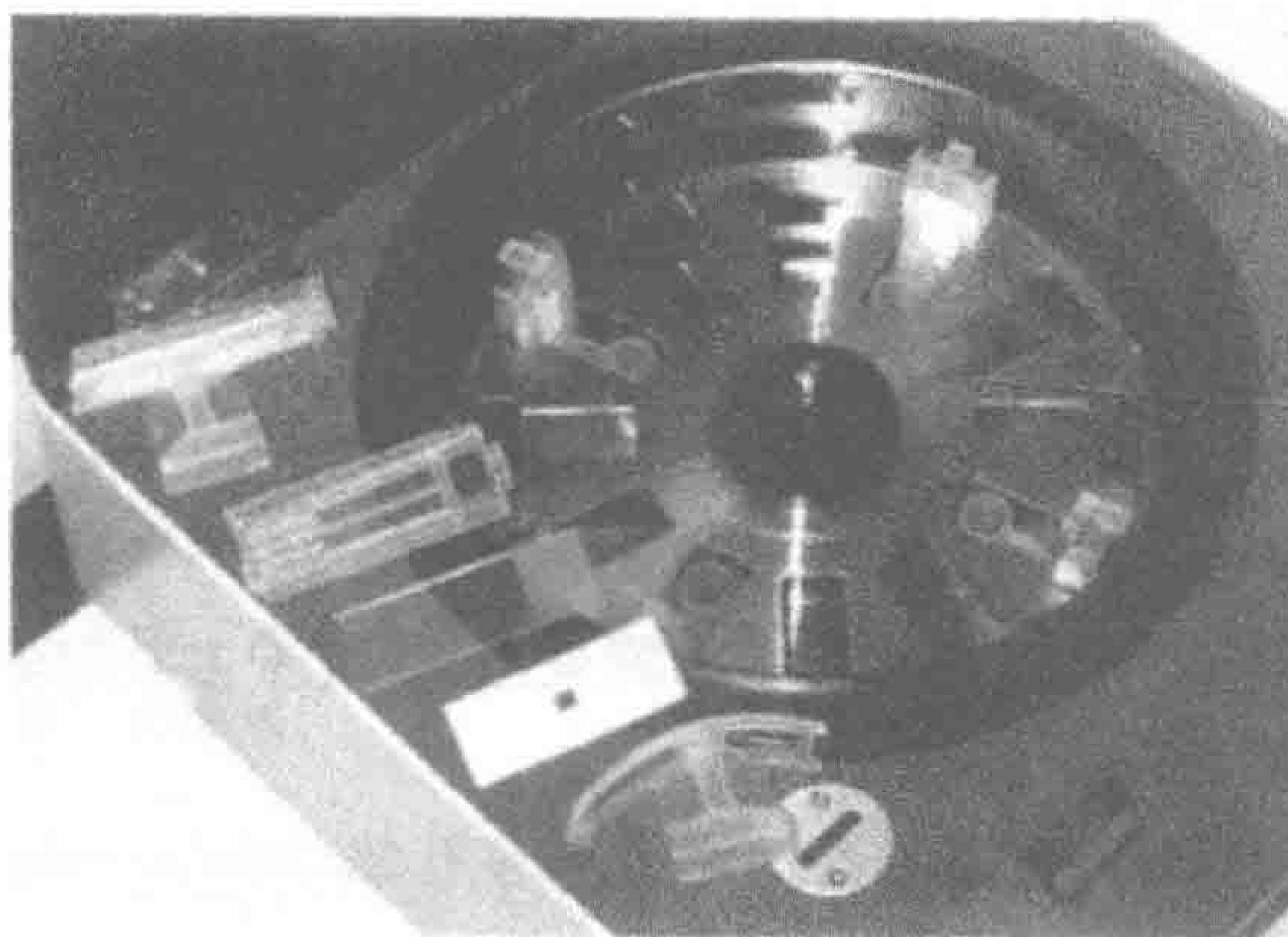


图 18.4 细胞甩片离心机。离心机内部结构，可见转头和聚丙烯持片架，左侧是已卸下来的一个持片架（Sakura Finetek）

方案 18.4 利用细胞甩片离心机制备用于细胞学研究的悬浮细胞

概要

将少量的浓缩细胞原位放置于标本室，对应放上载玻片，离心使细胞落到载玻片上。

材料

非无菌

- 用 50%~100%血清悬浮的细胞悬液，5×10^5 个/mL
- 血清
- 甲醇
- 细胞甩片机（如 Cyto-Tek；另见补充材料中的附录III）
- 显微镜载玻片
- 离心用持片架
- 电扇

操作步骤

1. 将载玻片浸入血清进行包被，沥干。
2. 用电风扇吹干。
3. 玻片做好标记。
4. 将玻片装入持片架，置入转头中。
5. 将 1×10^5~2×10^5 个细胞悬于 200~400μL 培养基中，放在至少 2 个样品槽中（参见制造商的方案）。
6. 启动离心机，以 100*g* 的速度离心 5min 将细胞甩到玻片上。
7. 迅速干燥玻片，甲醇固定 10min。

有些细胞甩片机需要原位固定。

▲安全提示 如果离心人类或其他灵长目的细胞，则转头必须密封。

滴液技术 这一过程与染色体制备（参见方案 13.4）相同，但没有经过秋水仙胺和低渗处理。必须小心防止细胞团块形成，调整细胞浓度，确保细胞不要聚团。边缘的细胞可能会破碎。

组织学观察 常规单层或悬浮的培养物本身不适合进行组织学检测，但是已有多项技术使之成为可能。这些技术大多源于 3D 培养（参见 20.2 节～20.4 节），经两次包埋后制备的单层细胞和悬浮团块的切片除外，细胞首先在琼脂或琼脂糖中包埋、固定，然后在蜡或丙烯酸树脂中再次包埋（Turnpenny and Hanley，2007）。这项技术也可以应用于透射电镜观察（参见图 2.2）。

18.4.5 光学显微照相技术

数码照相技术极大地简化了光学显微照相技术。可以使用普通的单反照相机，配合相应的 K 型卡口和一个照相目镜，或者是一台可以从大多数显微镜制造商处购买的专用的数码显微照相机。选择 10M 像素以上的相机拍摄的分辨率足以公开发表。电荷耦合元件（CCD）照相机有额外的优势，可以在视频显示器上连续观察及连接至局域网进行文件存储、打印、传输和访问，详见方案 18.5。

方案 18.5 显微数码照相

概要

打开显微镜（参见方案 18.1），聚焦于标本的有关区域。检查相机与计算机的连接，将光导向相机，聚焦，保存图像。

材料

无菌或无菌制备

- 待检测培养物，在培养瓶侧面标记以防遮挡视野。确保培养物没有碎片，如在拍照前更换原来的培养液。

非无菌

- 倒置显微镜（参见 4.2.4 节、4.2.5 节）
- 10×、20×、40×相差物镜
- 适合 10×、20×、40×物镜的相差环的聚光镜
- 三筒机头或其他适于照相目镜和相机适配器的接口
- CCD 相机或带有 K 型卡口的 35mm 单反照相机
- 中性密度滤光片，2×和 4×
- 镜头纸
- 图像记录纸，或者照相设备自动记录
- 镜台测微尺玻片（如 NIBS 及大多数显微镜供应商）

操作步骤

1. 准备照相用的培养物

(a) 培养瓶培养物

(i) 将培养瓶拿到超净台中，松开瓶盖，冷却培养物。

(ii) 当培养物温度为室温时，盖紧瓶盖。可避免冷却引起的变形。

(iii) 转动培养液冲洗培养瓶顶部的内面，移除可能形成的冷凝物。

(iv) 直立培养瓶 10~20s，使培养液流下。

(b) 培养皿或培养板培养物。

(i) 在超净台中，冷却培养物。

(ii) 更换培养皿或培养板的盖子（确保样品标记在培养皿或培养板的底部）。

2. 选择好视野和放大倍数（4×最适于克隆或单层细胞排列方式；10×适于典型细胞图片；20×适于细胞细节的图片），避开培养瓶上的瑕疵或标记（总在培养瓶或培养皿的侧面做标记，而不是顶部或底部）。

3. 检查焦距

(a) 利用取景框或物镜中的标线，调节双筒目镜的焦距，适合自己的眼睛。

(b) 聚焦显微镜。

4. 打开显示器，检查屏幕上图像的密度和对比度，黑白相机利用变阻器调节显微镜光线强度，彩

色相机利用中性密度滤光片调整（如果色温不正确，照片可在后期电子加工处理）。

5. 如果需要，再聚焦显微镜。

6. 用适宜于最终用途及存储设备允许的分辨率存储照片（最低 1200 像素×900 像素），但如果随后发表需要的话，最好高一点，如 4000 像素×300 像素，因为可以后期降低分辨率但不能提高。

7. 调低电源亮度，防止培养物过热。

注意事项 可用红外滤光片将过热程度降到最低。

8. 将培养物重新放回培养箱。

9. 在同样放大倍数下，用测微尺重复步骤 3~6，得出放大倍率。如果图像采用相同的方式处理，则可用作标尺。

10. 根据文件名，在相机的数据记录或电子表格手动完成图片拍摄内容的记录，否则图像难以辨认。

11. 存储图像可利用 Adobe photoshop 程序浏览、编辑或格式化处理，也可使用高质量喷墨、彩色激光或热转印打印机打印图片。公开发表通常需要最低每英寸 300 个像素点（dpi）或每厘米 150 个像素点。

18.4.6 活细胞成像

现在有许多设备可以用于培养细胞的连续监测。几分钟到几小时的短期观察可以通过显微镜延时摄影技术完成（参见 18.6 节），在加热镜台或者孵育器中使用灌注小室，但是整个生长周期的连续观察可以使用常规培养瓶、皿，或者是孔板，置于配有内置相差镜头的孵箱中（Incucyte ChipMan）。这些仪器通过连续拍照分析运转，除了提供连续的可视化监测，还能实现细胞生长的定量评估（另见 23.1.2 节），甚至远程在线操作。这一技术可以提供细胞形态的数据、生长的数据及细胞运动情况的观察（参见 23.9.3 节；图 23.11、图 23.12）。其他的系统也是可用的（Jensen, 2013），其中有的有更复杂的分析工具，像多荧光和共聚焦显微镜拍照，常采用间隔性记录。

18.4.7 共聚焦显微镜

长时间或实时数码记录可以通过带有传统高通量摄像机或 CCD 的共聚焦显微镜实现。这一系统可以记录细胞中荧光探针的分布、定位改变和染色强度改变等事件。荧光图像可以用来定位细胞器，如细胞核或高尔基体复合物（Lippincott-Schwartz et al.，1991），测量细胞内钙的变动（Cobbold and Rink，1987），跟踪细胞内某种药物的渗透和运输（Neyfakh，1987；Bucana et al.，1990）。由于激发和检测系统能够在非常短的时间周期内可视化细胞内的光学部分，而且时间周期非常短，因此可以进行三维测量。分析水平图像得到垂直切面或者 *z* 切面（即沿着纵坐标）。因此共聚焦显微镜可以可视化三维培养系统内的细胞，像滤膜小室侵袭实验（Brunton et al.，1997）及组织工程构建（Smith et al.，2010）。

18.5 抗原标记

丰富的抗体和试剂盒的商业供应（如 Dako、R&D，另见补充材料中的附录III，抗体）使得免疫染色和 ELISA（酶联免疫吸附测定）检测成为细胞特性鉴定最有用的技术（表 18.2）。然而，

不管抗体源自何处，通过应用合适的对照物确定其特异性是十分重要的。和多抗血清一样，单克隆抗体对特殊的表位有高度特异性，但是特定细胞系抗原表位表达的特异性仍需证实。

表 18.2 在细胞系鉴别中使用的抗体

细胞类型	对应抗体	定位	特异性	说明
腺垂体	hGH	高尔基体和外分泌	高	
星型胶质细胞	GFAP	中间纤维骨架	高	（表 25.3）
B 淋巴细胞	CD22	细胞表面	高	B 淋巴细胞受体（BCR）的共同受体
未成熟 B 淋巴细胞	CD20	细胞表面	高	浆细胞没有
乳腺上皮细胞	α-乳清蛋白，酪蛋白	高尔基体和外分泌	高	需要分化诱导
结、直肠和肺腺癌细胞	CEA	细胞表面和高尔基体	中等	细胞黏附分子
内皮	Ⅷ因子	Weibl-Palade 小体	高	颗粒状外观，诊断价值
	V-CAM	细胞表面	高	细胞黏附分子
上皮	L-CAM	细胞表面	高	细胞黏附分子
	细胞角蛋白	中间纤维骨架	高	某些抗体使间皮着色，不同上皮有特异性抗体
	EMA	细胞表面	高	与 HMFG 相同的抗原
	HMFG Ⅰ，HMFG Ⅱ	细胞表面	高	与 EMA 相同的抗原
胎肝细胞	AFP	高尔基体和外分泌	高	在肝肿瘤细胞中也表达
造血干细胞	CD34	细胞表面	高	也存在于前体，但成熟细胞没有
肝细胞	白蛋白	高尔基体和外分泌	高	需要分化
中胚层细胞	波形蛋白	中间纤维骨架	低	还表达于培养的上皮细胞和胶质细胞
间皮	间皮细胞抗原	细胞表面	高	
单核细胞和巨噬细胞	CD14	细胞表面	高	
髓样细胞	CD13	细胞表面	高	
肌细胞	结蛋白	中间纤维骨架	高	
神经和神经内分泌细胞	NSE	胞质	中等	可在 SCLC 中表达
神经细胞	N-CAM	细胞表面	中等	可在 SCLC 中表达
肺和胃神经内分泌细胞	GRP	高尔基体和外分泌	中等	可在 SCLC 中表达
神经元细胞	神经纤维蛋白	中间纤维骨架	高	也可使某些 SCLC 着色
少突胶质细胞	髓鞘碱性蛋白	细胞表面	高	也可使外周神经元着色
胎盘上皮细胞	Gal-C	细胞表面	高	（表 25.3）
	hCG	高尔基体和外分泌	低	也可在某些肺肿瘤表达
前列腺上皮细胞	PSA	高尔基体和外分泌	高	
干细胞	ABC 转运蛋白	跨膜	中等	也可在某些耐药细胞中表达
	SSEA-1	细胞表面	高	
	NANOG	转录因子	高	
	OCT4	转录因子	高	
T 淋巴细胞	CD3	细胞表面	高	
T 淋巴细胞和内皮细胞	I-CAM	细胞表面	中等	

注：列表中仅是例子，并不全面，现在有太多抗原标记物（参见补充材料中的附录Ⅲ，抗体）

缩略词：AFP. 甲胎蛋白；CEA. 癌胚抗原；EMA. 上皮细胞膜抗原；Gal-C. 半乳糖脑苷脂；GFAP. 神经胶质纤维酸性蛋白；GRP. 胃泌素释放肽；hCG. 人绒毛膜促性腺激素；HMFG. 人乳脂肪球蛋白；I-CAM. 细胞间黏附分子；NSE. 神经元特异性烯醇化酶；PSA. 前列腺特异抗原；SCLC. 小细胞肺癌

18.5.1 免疫染色


彩版 11


彩版 12


彩版 15


彩版 20

抗体与荧光素结合（如荧光蛋白、罗丹明），则抗体通过荧光定位；或抗体与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶结合，抗体定位由酶活性作用所得沉淀物来确定（Polak and Van Noorden，2002）。荧光染色可以是直接的，即特异性抗体本身与荧光素或酶结合，直接用于样品染色。然而，通常使用间接方法：第一抗体（特异性）以其天然形式使用，与样品中的抗原结合，随后用第二种抗体（二抗，即针对一抗而制备的免疫球蛋白），二抗可用荧光素标记、用荧光显微镜观察（见彩版 11a，彩版 15d，彩版 20c~f），也可用过氧化物酶标记经过产色底物显色后用常规显微镜观察（见彩版 11b~d，彩版 12a、b），详见方案 18.6。

迄今有各种各样的方法来提高这些检测方法的敏感性，特别是过氧化物酶偶联法。过氧化物酶-抗过氧化物酶（PAP）技术，使用与一抗同种属的抗过氧化物酶抗体结合的过氧化物酶反应，得到进一步的放大（Polak and Van Noorden，2002）。生物素化二抗与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶（GE Healthcare）标记的链霉卵白素结合，或用金标二抗（Abcam）后银染加强，可以获得更好的放大效应。

可变条件

固定。细胞表面特别是对固定剂敏感的抗原，首先用抗体处理，然后按步骤 2 进行后固定，使用玻璃介质时，可用冷的丙酮代替酸性乙醇。

方案 18.6 间接免疫荧光

概要

固定细胞，顺序加入一抗和二抗，通过 UV 观察。

材料

无菌或无菌制备

- 细胞培养在盖玻片，或培养室载玻片或聚苯乙烯培养皿上

非无菌

- 新鲜制备的固定剂：5%乙酸乙醇溶液（放在–20℃）
- 用含 10%的 FBS 培养液，按（1∶1000）~（1∶100）比例稀释的一抗
- 对应于不同的产生一抗种属的二抗（如一抗由兔产生，则二抗应来自不同动物，如山羊抗兔免疫球蛋白）；二抗用荧光素或罗丹明标记
- 猪血清或其他封闭剂
- D-PBSA
- 封固剂：含 50%甘油的 D-PBSA，其中含有荧光淬灭抑制剂（Vecta）

操作步骤

1. 用 D-PBSA 洗涤长有细胞的盖玻片，置于合适的培养皿中，如 13mm 盖玻片可用 24 孔板。
2. 将培养皿置于–20℃，10min，再加入冷的固定剂，静置 20min。
3. 去除固定剂，在 D-PBSA 中洗盖玻片，加入 1mL 正常猪血清，室温下放置 20min。
4. 用 D-PBSA 淋洗盖玻片，用吸水纸吸干，将盖玻片翻转，置于一滴 50μL 已稀释的一抗上。
5. 37℃条件下放置 30min 后，室温下 1~3h 或 4℃条件下过夜，若在 4℃孵育，抗体可稀释到 1∶1000。
6. 用 D-PBSA 淋洗盖玻片，转移到按 1∶20 稀释的二抗中，37℃、20min。
7. 用 D-PBSA 淋洗盖玻片，用含 50%甘油和荧光淬灭延迟剂（Vecta）的 D-PBSA 封固于载玻片上。
8. 在荧光显微镜下观察玻片。

间接过氧化物酶。用过氧化物酶偶联的抗体代替步骤 6 中的荧光抗体，然后加过氧化物酶底物（DAB 显色后的玻片可进行脱水并用 DPx 封片，但乙基咔唑显色必须用甘油封片，如步骤 7）。

PAP。在步骤 6 中使用过氧化物酶偶联二抗，然后将盖玻片转移到 D-PBSA 稀释的 PAP 复合物（1∶100）（多数免疫生物供应商如 Dako、Vecta 都有）中 20min，淋洗，加入过氧化物酶底物进行间接过氧化物酶法，孵育，洗涤，封片。

细胞表面标记物。特殊细胞表面抗原通常在活细胞中染色（在 4℃加入叠氮钠可抑制胞饮作用），而细胞内抗原用已固定的细胞进行染色，有时需要胰蛋白酶轻微消化，以抗体与抗原接触。

人类白细胞抗原（HLA）和血型抗原在许多人类细胞系中有表达，并作为一种有用的鉴定工具。HLA 多态性更具有价值，特别是供体概况已知时（Pollack et al.，1981；Hurley and Johnson，2001）。

18.5.2 免疫分析

细胞抽提物可在包被抗体的微孔板中通过 ELISA 来检测。这些检测都有试剂盒（如 Enzo；R&D），而且可进行标记物和蛋白质表达产物的定量。抗原表达也可通过流式细胞仪（参见 17.3.2 节和 23.7.2 节）、多细胞液流分析（Agilent，2100）（图 18.5）或抗体微阵列分析（如 Affymetrix）进行自动化和定量分析（Barber et al.，2009；Simara et al.，2009）。

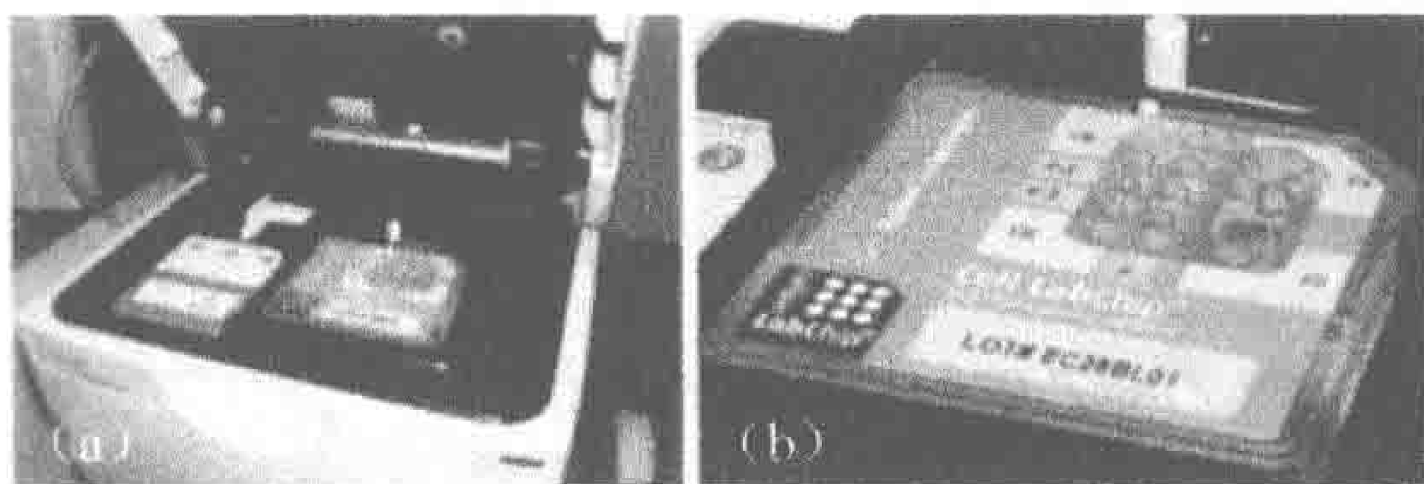


图 18.5 Agilent 免疫分析机。Agilent 2100 型，可处理多重荧光染色样品的同时分析。（a）样品室；（b）样品槽（PromoCell）

共聚焦显微镜的引入为免疫染色物质提供了更高的分辨率和 3D 分析的能力。由于这一系统可以将观察和记录的图像限定到一个非常薄的光学切面，没有相邻层面的干扰，每个焦平面都可以非常清晰地观察。

荧光显微镜现在使用光子激发定位显微镜（PALM）通过基于探针的超分辨率的图像采集可

以达到纳米的精确度。光子激发定位显微镜的激发简短而瞬时，随后立即漂白，一次只有少数荧光团被激发并记录，没有周围荧光团的干扰，所以达到很高的分辨率。然后可以从这些简短瞬时的发射光合成高分辨率的复合图像（Lippincott-Schwartz and Manley，2009）。

18.6 间隔性记录

方案 18.7 缩时图像记录

提供者：D. Zicha，Cancer Research UK London Research Institute, Lincoln's Fields Laboratories, Light Microscopy, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LY, UK. daniel.zicha@cancer.org.uk.

最初根据电影摄影技术发明了间隔性记录，通过间隔性记录能以很快的速率观察自然缓慢的过程。开始时，这种技术需要一台通过定时装置信号进行自动控制的摄像机。20 世纪 20 年代，Ronald Canti 首次开始用间隔性电影摄影技术记录培养细胞的行为（Canti，1928）。50 年代，Michael Abercrombie 首先用这种技术以精确的定量方法研究了培养细胞的行为（Abercrombie and Heaysman，1953）。之后电视系统逐渐取代了电影胶片，"电视显微镜"与光学显微镜结合，完善了其用途（Inoué and Spring，1997）。电视图像的质量不断得到改进，电视图像的数字形式最终取代了 16mm 胶片（Entwistle，1998）。然而，显微镜技术本身在整个程序中仍起着关键性的作用。绿色荧光蛋白（GFP）和其他生物荧光蛋白（Shaner et al.，2005）的发展可以使活细胞的特异亚细胞结构标上荧光，使得组织培养的间隔记录发生革命性改观，也极大地扩大了其应用范围。标准显微镜技术是以有限数目的记录来详细分析细胞的行为，因此常以逐一的图像为基础进行人工或交互操作，以数字图像程序对这种记录的自动分析较为困难，而且对特殊的应用通常也不便捷（Zicha and Dunn，1995）。荧光记录的自动化分析比起诸如相差等那些商业化的显微镜技术要容易得多。对未染色的脊椎动物组织培养细胞进行全自动分析可用双束干涉显微镜（Dunn and Zicha，1993）或转象相差干涉仪（quadrature interferometry）（Hogenboom et al.，1998）来完成。这些技术目前尚无商业性服务，但类似的信息可以从诸如 Lyncee Tech 这样的数字全息显微镜技术获得。对细胞行为的自动评价是时间间隔性分析应用的一个重要方面，因为有大量的数据需要处理，以应对相关现象的高内在可变性。

概要

用一个有玻璃底面的塑料 Petri 培养皿培养细胞，对于显微镜技术这样做能够获得更好的光学特性。显微镜装有与记录计算机相连的录像机或高质量的科学摄影机，附加设备为细胞培养提供理想的环境条件（温度、CO_2、湿度）。在记录过程中，通过计算机触发每次的曝光，计算机控制快门可一次也可多次，以便排除对细胞不必要的照明。

材料

无菌

- 培养液：如 DMEM，不含酚红（为了降低背景的自发荧光），但含有其他标准补充物
- Petri 培养皿：塑料或玻璃底面（如购自 MatTek），或者用一个培养皿，将玻璃盖片胶粘在其底部覆盖住整个孔

非无菌

- 倒置显微镜（如 Eclipse TE2000-E，Nikon）

- 可提供 37℃、CO_2 及湿度的环境孵育箱：如 Cube/Box/Brick（Life Imaging Services）
- 计算机控制的快门和滤光片轮系统：如 Lambda10-3（Sutter Instrument Co.）
- 摄影机：如 CoolSNAP cf（Photometrics）
- 带有成像软件的控制计算机：如 Metamorph 软件包（Molecular Devices），可以延时模式记录显微影像

操作步骤

1．在 Petri 培养皿中接种约 30 000 个细胞（为了观察一个一个的细胞，要达到亚汇合），在 37℃和含 10% CO_2 的湿润条件下将细胞放置过夜。

2．打开所有设备的开关，特别是加热器。最好先打开加热器的开关（通常 40min 至 1h 已足够），使环境孵育箱内的温度恒定。

3．将接种有细胞的 Petri 培养皿放在孵育箱内。

4．应用相应的显微镜技术，如使用带有 Plan Fluor ELWD 20×0.45 Ph1DM 物镜的相差和荧光显微镜。较短工作距离的高放大率物镜需要使用有玻璃底面的 Petri 培养皿。

5．用 Metamorph 图像系统交替获取相差和荧光图像。

（a）在事先没有数据的情况下，要用镜台测微尺标定图像大小。

（b）在 Apps 上选择多向采样申请表。

（c）在主表上选择时间间隔和多个波长。

（d）在储存表中选择直接的和特异的基点名称。

（e）在时间间隔表上选择时间点数和时间间隔。分析缓慢运动的细胞（如成纤维样细胞）的位移，用 5min 间隔将得到满意结果。而观察变化较快细胞的形态时，只需要 1min 或甚至更短的间隔时间。同样，观察快速运动细胞（如中性白细胞）的位移也只需要 1min 或更短的间隔时间。

（f）在波长表上选择波长数为 2，用曝光表选择出合适的照明配置（快门和滤片轮的位置），用 Snap 钮和 Live 钮核对图像，通常曝光时间 0.1s 对于相差已足够，而弱荧光则需要较长的曝光时间，如 0.4s。

（g）在采集图像的过程中，预观察钮有助于调节显示的窗口。

（h）用预示窗口的 Start 钮或多维采集窗口主页上的 Acquire 钮开始采集图像。

（i）相差和荧光无论是独立使用或联用，采集图像之后都可利用回放多维数据应用程序分别看到系列的相差影像和荧光影像。

6．将系列图像储存在数据库或其他备用的媒介器内。

▲**安全提示** 用于荧光激发的弧光灯发出的 UV 射线有一定的危险性，使用这些光源应遵从制造商的说明书。

结果分析 图像软件 Metamorph 可用于对图像的位置、面积和强度的交互或自动测量。该软件可应用于荧光图像分析，利用中心位置评价细胞的移位，评价细胞的伸展面积、荧光信号的强度或形态学研究中的各种形态因子。

可变条件 有关组织培养细胞的时间间隔记录的更多信息可参阅有关文献（Gray and Zicha，2011）。培养液的选择取决于在观察状态下对细胞的要求。含有 Hanks 盐的培养液具有在密封的培养小室中自动平衡 pH 的优点。现在还有具有灌注选择的特殊小室（例如，购自 Warner Instruments 的 Confocal Imaging Chamber RC-30HV）。对于相差技术来说，常选用差别干涉相差

（DIC），它在高分辨率条件下可以改善细微之处的对比。用多孔板进行时间间隔分析也流行起来，在电动台面上用多视野记录仪分析结果，可通过商业化途径购得软件以支持这种仪器。不必再考虑基于胶片的摄影方法，甚至不用再考虑用磁盘或录像带的录像记录方法进行时间间隔分析，因为目前计算机的数字记录提供了很大方便及其他特点，包括相差增强作用、降低背景和分析支持等图像处理性能。适合于 Mac 和 Windows 操作系统的可选择的间隔记录软件包有 Volovity（Perkin Elmer）或 μManager（Micro-Manager）。

18.7 细 胞 周 期

为了追踪细胞周期的进程，已发明了许多技术，可将细胞群体分离或进行代谢性阻断，然后再回到常规培养，这种周期同步化的作用是使细胞都处于同步的增殖阶段（Jackman and O'Connor，2001）。

18.7.1 细胞分离

细胞分离技术已在第 17 章叙述过。可以利用单位重力沉降（Shal and McClelland，1971；Shall，1973）进行分离；但如果需要大量的细胞（$>5\times10^7$个），离心淘洗法更为可取（Mikulits et al.，1997）（图 17.4）。也可通过无毒的可逆性 DNA 染色剂如 Hoechst 33342 标记细胞，进行荧光激活细胞分选（图 15.7、图 15.8）。虽然这种方法分离的细胞产量比离心淘洗法少（约 10^7 个细胞或更少），但分离的细胞纯度较高。

分离同步化细胞的最简单的技术之一是采用振动脱落法收集有丝分裂的细胞：分裂中期的单层细胞趋向于变圆，摇晃培养瓶可使这些细胞脱落。CHO 细胞（Tobey et al.，1967；Petersen et al.，1968）和 HeLa-S_3 细胞的一些亚系用这种方法的效果很好。在 4℃条件下将细胞放置 30min 至 1h，可使细胞的分裂周期处于同步（Rieder and Cole，2002），从而增加振动脱落有丝分裂细胞的数量（Mille et al.，1972）。

18.7.2 阻断

有下列两种阻断方法。

（1）代谢性抑制剂。①抑制 DNA 合成，胸腺嘧啶脱氧核苷；②抑制细胞周期进程，G_1 期阻断（iovastatin）、S 期阻断（aphidicolin，minosine）、G_2/M 期阻断（nocodazole）（Jackman and O'Connor，2001）。由于多数试剂具有毒性，它们可在细胞周期各期而不是只在 G_1 期阻断细胞，从而可导致细胞衰退并进入细胞凋亡，故这些试剂的作用是不同的。因此，培养细胞中可含有不能生存的细胞、已经阻断在周期中但能生存的细胞和已经逃避阻断的细胞（Yoshida and Beppu，1990）。

（2）缺乏营养（G_1 期阻断）。在这些情况下，从培养液中将血清（Chang and Baserga，1977）或异亮氨酸（Ley and Tobey，1970）除去 24h，然后恢复，由此通过周期转换同步恢复细胞的生长（Yoshida and Beppu，1990；Jackman and O'Connor，2001）。

只在第一个周期才能获得高度同步（如>80%），第二个周期时同步程度可能<60%，第三个周期时细胞周期分布可能接近于随机分布。化学性阻断对细胞常有毒性，营养缺乏对许多转化细胞的同步化效果欠佳。物理性分离技术因对细胞几乎无害可能是最有效的（参见 17.2 节和 17.3.2 节）。

参考文献

Abaza NA, Leighton J, Schultz SG (1974). Effects of ouabain on the function and structure of a cell line (MDCK) derived from canine kidney; I: Light microscopic observations of monolayer growth. *In Vitro* **10**:172–183.

Abercrombie M, Heaysman JE (1953). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp. Cell Res.* **5**:111–131.

ATCC (www.atcc.org; search for cell line in catalog and select Characteristics tab).

Barber N, Gez S, Belov L, Mulligan SP, Woolfson A, Christopherson RI (2009). Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray. *FEBS Lett.* **583**:1785–1791.

Barker N, Tan S, Clevers H (2013). Lgr proteins in epithelial stem cell biology. *Development* **140**:2484–2494.

Bignami A, Dahl D, Rueger DG (1980). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in normal neural cells and in pathological conditions. In Federoff S, HertzL (eds.), *Advances in cellular neurobiology*, Vol. 1. New York: Academic Press.

Biolog, Inc. *Phenotype microarrays* (www.biolog.com/products-static/phenotype_mammalian_cells_overview.php) .

Bishop AE, Power RF, Polak JM (1988). Markers for neuroendocrine differentiation. *Pathol. Res. Pract.* **183**:119–128.

Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G. (1992). Cultured aortic smooth muscle cells from newborn and adult rats show distinct cytoskeletal features. *Differentiation* **49**:175–185.

Brouty-Boyé D, Kolonias D, Savaraj N, Lampidis TJ (1992). Alpha-smooth muscle actin expression in cultured cardiac fibroblasts of newborn rat. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**:293–296.

Brunton V, Ozanne B, Paraskeva C, Frame M (1997). A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an *in vitro* model for the progression of colon cancer. *Oncogene* **14**:283–293.

Bucana CD, Giavazzi R, Nayar R, O'Brian CA, Seid C, Earnest LE, Fan D (1990). Retention of vital dyes correlates inversely with the multidrug-resistant phenotype of adriamycin-selected murine fibrosarcoma variants. *Exp. Cell Res.* **190**:69.

Burchell J, Taylor-Papadimitriou J (1989). Antibodies to human milk fat globule molecules. *Cancer Invest.* **17**:53–61.

Canti RG (1928). Cinematograph demonstration of living tissue cells growing in vitro. *Arch. Exp. Zellforsch.* **6**:86–97.

Cell line enclycopedia (www.broadinstitute.org/ccle/home) .

Chan, H, Baserga R (1977). Time of replication of genes responsible for a temperature sensitive function in a cell cycle specific to mutant from a hamster cell line. *J. Cell Physiol.* **92**:333–343.

Cobbold PH, Rink TJ (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free Ca. *Biochem. J.* **248**:313.

COSMIC database (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/) .

DeMars R (1957). The inhibition of glutamine of glutamyl transferase formation in cultures of human cells. *Biochim. Biophys. Acta* **27**:435–436.

Dickson JD, Flanigan TP, Kemshead JT (1983). Monoclonal antibodies reacting specifically with the cell surface of human astrocytes in culture. *Biochem. Soc. Trans.* **11**:208.

Dunn GA, Zicha D (1993). Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **47**:91–106.

Edvardsson L, Olofsson T (2009). Real-time PCR analysis for blood cell lineage specific markers. *Methods Mol. Biol.* **496**:313–322.

Entwistle A (1998). A comparison between the use of a high-resolution CCD camera and 35 mm film for obtaining coloured micrographs. *J. Microsc.* **192**:81–89.

Freshney RI (1980). Culture of glioma of the brain. In Thomas DGT, Graham DI (eds.), *Brain tumours: Scientific basic, clinical investigation and current therapy*. London: Butterworths, pp. 21–50.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR (1978). Determination of cell shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* **38**:4155–4171.

Granner DK, Hayashi S, Thompson EB, Tomkins GM (1968). Stimulation of tyrosine aminotransferase synthesis by dexamethasone phosphate in cell culture. *J. Mol. Biol.* **35**:291–301.

Gray C, Zicha D (2011). Microscopy of living cells. In DavisJ (ed.), *Animal cell culture: Essential methods*, Hoboken, NJ: Wiley.

Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* **7**:3112–3118.

Heyderman E, Steele K, Ormerod MG (1979). A new antigen on the epithelial membrane: Its immunoperoxidase localisation in normal and neoplastic tissue. *J. Clin. Pathol.* **32**:35–39.

Hogenboom DO, Dimarzio CA, Gaudette TJ, Devaney AJ, Lindberg SC (1998). Three-dimensional images generated by quadrature interferometry. *Opt. Lett.* **23**:783–785.

Hurley CK, Johnson AH (2001). HLA type of EBV-transformed human B cell lines, *Current Protocols in Immunology*, Appendix 1G.

IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium) (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860–921.

Inoué S, Spring KR (1997). *Video microscopy*, 2nd ed. New York and London: Plenum Press.

Jackman J, O'Connor PM (2001). Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle, *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 8, Unit 8.3.

Jensen EC (2013). Overview of live-cell imaging: Requirements and methods used. *Anat. Rec.* (Hoboken) **296**(1):1–8.

Kiefer J, Alexander A, Farach-Carson MC (2004). Type I collagen-mediated changes in gene expression and function of prostate cancer cells. *Cancer Treat. Res.* **118**:101–124.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M (2007). Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer–observations in vitro and in vivo. *Cells Tiss. Organs* **185**:191–203.

Kondo T, Raff M (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**:1754–1757.

Krueger SA, Wilson GD (2011). Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods Mol. Biol.* **731**:359–370.

Labarge MA, Petersen OW, Bissell MJ (2007). Culturing mammary stem cells. In FreshneyRI, StaceyGN, AuerbachJM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 282–302.

Lane EB (1982). Monoclonal antibodies provide specific intramolecular markers for the study of tonofilament organisation. *J. Cell Biol.* **92**:665–673.

Le Page C, Ouellet V, Madore J, Ren F, Hudson TJ, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM (2006). Gene expression profiling of primary cultures of ovarian epithelial cells identifies novel molecular classifiers of ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **94**:436–445.

Lever J (1986). Expression of differentiated functions in kidney epithelial cell lines. *Min. Elec. Metab.* **12**:14–19.

Ley KD, Tobey RA (1970). Regulation of initiation of DNA synthesis in Chinese hamster cells; II: Induction of DNA synthesis and cell division by isoleucine and glutamine in G_1-arrested cells in suspension culture. *J. Cell Biol.* **47**:453–459.

Liang-Chu MM, Yu M1, Haverty PM, Koeman J, Ziegle J, Lee M, Bourgon R, Neve RM (2015). Human biosample authentication using the high-throughput, cost-effective SNPtraceTM system. *PLoS ONE* **10**(2):e0116218.

Lindl T, Steubing R (2013). *Atlas of living cell cultures*. Weinheim: Wiley Blackwell.

Lippincott-Schwartz J, Manley S (2009). Putting super-resolution fluorescence microscopy to work. *Nat. Methods* **6**:21−23.

Lippincott-Schwartz J, Glickman J, Donaldson JG, Robbins J, Kreis TE, Seamon KB, Sheetz MP, Klausner RD (1991). Forskolin inhibits and reverses the effects of Brefeldin A on Golgi morphology by a cAMP-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **112**:567.

Martins-Taylor K, Xu RH (2012). Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **30**(1):22−27.

Mikulits W, Dolznig H, Edelmann H, Sauer T, Deiner EM, Ballou L, Beug H, Mullner EW (1997). Dynamics of cell cycle regulators: Artefact-free analysis by recultivation of cells synchronized by centrifugai elutriation. *DNA Cell Biol.* **16**:849–859.

Miller GG, Walker GWR, Giblack RE (1972). A rapid method to determine the mammalian cell cycle. *Exp. Cell Res.* **72**:533–538.

Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* **31**:11–24.

Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Iwama A (2014). Manipulation of hematopoietic stem cells for regenerative medicine. *Anat. Rec.* (Hoboken) **297**:111−120.

Neyfakh AA (1988). Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res.* **174**:168–176.

Petersen DF, Anderson EC, Tobey RA (1968). Mitotic cells as a source of synchronized cultures. In PrescottDM (ed.), *Methods in cell physiology*. New York: Academic Press, pp. 347–370.

Petersen OW, Gudjonsson T, Villadsen R, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L (2003). Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif.* **36**(Suppl. 1):33–44.

PHE Culture Collections—ECACC (https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/index.aspx ; search for cell line in General Cell Collection and select Product Images).

Polak JM, Van Noorden S (2002). *Immunocytochemistry*. Milton Park, UK: Garland Science.

Pollack MS, Heagney SD, Livingston PO, Fogh J (1981). HLA-A, B, C & DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**:1003–1012.

Rabito CA, Tchao R, Valentich J, Leighton J (1980). Effect of cell substratum interaction of hemicyst formation by MDCK cells. *In Vitro* **16**:461–468.

Ramaekers FCS, Puts JJG, Kant A, Moesker O, Jap PHK, Vooijs GP (1982). Use of antibodies to intermediate filaments in the characterization of human tumors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **46**:331–339.

Rieder CL, Cole RW (2002). Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* **1**:169–175.

Sarang Z, Haig Y, Hansson A, Vondracek M, Wärngård L, Grafström RC (2003). Microarray assessment of fibronectin, collagen and integrin expression and the role of fibronectin-collagen coating in the growth of normal, SV40 T-antigen-immortalized and malignant human oral keratinocytes. *ATLA* **31**:575−585.

Shall S (1973). Sedimentation in sucrose and Ficoll gradients of cells grown in suspension culture. In Kruse PF, Patterson MK (eds.), *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press, pp. 198–204.

Shall S, McClelland AJ (1971). Synchronization of mouse fibroblast LS cells grown in suspension culture. *Nat. New Biol.* **229**:59–61.

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**:905−909.

Simara P, Koutna I, Stejskal S, Krontorad P, Rucka Z, Peterkova M, Kozubek M (2009). Combination of mRNA and protein microarray analysis in complex cell profiling. *Neoplasma* **56**:141−149.

Smith LE, Smallwood R, Macneil S (2010). A comparison of imaging methodologies for 3D tissue engineering. *Microsc. Res. Tech.* **73**(12):1123−1133.

Tobey RA, Anderson EC, Peterson DF (1967). Effect of thymidine on duration of G1 in chinese hamster cells. *J. Cell Biol.* **35**:53–67.

Turnpenny L, Hanley N (2007). Culture of the human germ cell lineage. In Freshney RI, StaceyGN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJP Wiley, pp. 107−132.

Wu YJ, Parker LM, Binder NE, Beckett MA, Sinard JH, Griffiths CT, Rheinwald JG (1982). The mesothelial keratins: A new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* **31**:693–703.

Yalcin B1, Adams DJ, Flint J, Keane TM (2012). Next-generation sequencing of experimental mouse strains. *Mamm. Genome* **23**:490−498.

Yoshida M, Beppu T (1990). In DoyleA, Griffiths JB, Newell DG (eds.), *Cell and tissue culture: Laboratory procedures*. Chichester, UK: Wiley, Module 4E2.

Zhang Q, Iida R, Yokota T, Kincade PW (2013). Early events in lymphopoiesis: An update. *Curr. Opin. Hematol.* **20**:265−272.

Zicha D, Dunn GA (1995). An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *J. Microsc.* **179**:11−21.

（卞晓翠 刘玉琴 译）

第19章

分　化

分化过程及分化与细胞增殖的关系已经在第 2 章讨论过了（参见 2.4 节）。本章将进一步了解分化过程并阐述某些分化机制，据此可以在体外来控制分化。

从结构基因的转录、转录因子对激素、细胞因子及细胞外基质成分等细胞外信号的反应，到 mRNA 的转运和表观遗传调控、蛋白质的合成和降解率、蛋白质糖基化等，都可以不同程度地调节分化。历史上，尝试进行诱导分化的焦点一直放在诸如皮质醇、类视黄醇、各种细胞因子、平面极性复合物如 DMSO 和 HMBA 等诱导剂上，但是目前，诱导分化的关注点正转向如何通过转录因子，或者通过改变 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化来直接改变基因转录。此外，定向分化及单向性分化进程因为基因表达的可塑性已经颠覆了原有的理解，细胞可以在正确的刺激下往分化方向进展，但是在不同的条件下，细胞可能逆转为更原始的前体细胞、单胚层多能性或多胚层多能性干细胞（参见 2.4.2 节）。可诱导分化的靶细胞范围也已经扩大，不仅包括已经具有定向分化为特定细胞系的前体细胞，也包括从胚胎和成体组织中分离的干细胞或者重编程的成熟细胞。

19.1　体内表型的表达

作为细胞系而培养和增殖的细胞，其表型常常有别于这些细胞在原来组织中的主体细胞表型（参见 2.4.2 节）。这是因为在体内存在有调节因子，调节细胞形态、生长和功能，而体外微环境中缺乏这些因子（参见 20.1 节）。分化（differentiation）是体内功能成熟的细胞表达其特征性表型蛋白的过程。这个过程可以是不可逆的，如成红细胞核、神经元或成熟的表皮细胞中 DNA 合成的终止；或者是可逆的，如肝再生时，成熟肝细胞可以重新分化成前体细胞。分化细胞的某些特征具有适应性（adaptive），如分化的肝细胞可以合成白蛋白，培养时这种功能通常会丧失，但能被重新诱导出来（Che Abdullah et al.，2014）。本章提到的分化将综合描述成熟细胞的固有（constitutive）特征（不需诱导可稳定表达）和适应性（adaptive）特征（其表达依赖于正性和负性调节）。定向（commitment）意味着干细胞不可逆地转化成某种特定的细胞谱系，能潜在表达有限的特性。然而，随着某些前体细胞能重新变回或转化成多潜能干细胞（Kondo and Raff，2000，2004；Le Douarin et al.，2004）（参见 19.4 节），甚至完全成熟的细胞也能被重编程形成多能干细胞（参见 19.5 节、26.3.7 节）的实验证据出现后，定向的概念受到了质疑。

终末分化（terminal differentiation）指的是细胞已经进入到一个特定细胞谱系的某一点，细胞的成熟表型能够完全表达，至此细胞停止分化。在这一阶段，某些细胞可能被逆转，如纤维细

胞，能逆转成低分化的表型，甚至被逆转成干细胞，重新增殖；有些细胞如成红细胞、神经元、骨骼肌或角化鳞状上皮则不能被逆转。

19.1.1 去分化

去分化（dedifferentiation）这一概念一直被用来描述当组织发生恶变或在体外培养时，分化特性丢失的状态。由于去分化是由包括细胞死亡、选择性过度生长及适应性反应等几个因素共同构成的复杂过程，因此应谨慎使用这一概念。正常的情况下，去分化意味着与成熟细胞相关的特定表型特征的消失。去分化发生时，既可以是适应性过程，即通过合适的诱导，细胞可以重新获得分化表型（参见 2.4 节）；也可以表现为选择性过程，意指前体细胞由于具有更大的增殖潜能而被选择出来。如果给予适当刺激，在任何一种情况下，前体细胞都可以被诱导成熟直至完全分化或被逆转回干细胞（参见 19.1.1, 19.5 节）。

19.1.2 细胞谱系选择

早期，对培养的细胞尝试分化却失败的大部分原因在于选择了错误的细胞进行培养。例如，会选择来自肝间质内的成纤维细胞或者肝窦内皮细胞，而不是肝细胞，利用生长因子如血小板源性生长因子（PDGF）和抑制上皮细胞增殖的转化生长因子（TGF-β），在含有血清的培养基里进行诱导分化。选择性培养液发展的改进，意味着我们现在可以选择正确的细胞谱系进行培养，明确在化学调节物和空间结构上是否使用了正确的诱导微环境成为目前的主要挑战。

19.2 分 化 阶 段

在成体器官中有两个主要的分化途径。在不断更新的组织，如表皮、小肠黏膜和血液中，一小群干细胞能够自我更新，按照需要长成前体细胞，后者进一步增殖并进入终末分化，至终末阶段，这些细胞将失去分裂能力（参见图 2.6）。这个过程导致了成熟，正常情况下，分化的细胞不再分裂。前体细胞的增殖受负反馈调节，从而生成适当大小的分化细胞池。

除应对损伤而进行的自身修复外，这一过程在组织中不会迅速发生变化，静止组织很少增殖；然而，成熟细胞可能会重新进入分裂状态。例如，在结缔组织中，诸如纤维细胞这样的细胞，就可以对局部细胞密度的降低和（或）对一个或多个生长因子的出现而发生反应，表现为失去分化特性（如胶原合成）并重新进入细胞周期。当组织通过细胞分裂而重新获得合适的细胞密度时，细胞增殖停止而分化过程又被重新诱导出来。因为募集了相对大量的细胞，这种更新是迅速的。

目前尚不明确重新进入细胞周期使组织再生的细胞，是否与大多数分化的细胞群具有一样的表型特征，或者它们是否是逆向分化细胞的一部分。在肝中，通过再生进行损伤应答，看起来成熟的肝细胞能重新进入细胞周期；而在骨骼肌，终末细胞不能重新进入细胞周期，再生细胞来源于卫星细胞，它们形成了静止干细胞群（参见 25.3.3 节，方案 25.14-Su、25.15-Su）。成熟的纤维细胞、血管内皮细胞和神经胶质细胞似乎都能够重新进入细胞周期进行再生，但这并不能排除在总的细胞群之内可能存在再生亚群。

19.3 增殖和分化

随着分化过程的进行，细胞分裂逐渐减少直至最终停止。在大多数细胞体系中，细胞增殖与分化特性的表达是难两立的（参见图 2.7）。肿瘤细胞有时能够突破这种限制，如黑色素瘤，细胞增殖的同时可以持续合成黑色素（Halaban，2004）。然而即使在这种情况下，当细胞分裂停止时，分化产物的合成也会增加。

这种关系在细胞培养中有重要意义，扩增和增殖通常是细胞培养的主要要求，因此，大多数细胞系不能充分表达分化特性也就不足为奇了。这一现象在许多年前就被器官培养者注意到了（参见 20.2 节），他们开始设法保持三维、高细胞密度的组织结构，并设法阻止细胞的解离和未分化细胞的选择性过度生长。然而，虽然在阐明细胞通过相互作用来调节分化方面具有重要的价值，但器官培养仍然无法进行同一培养物的大量增殖，尤其是在需要极大数量的细胞时。此外，被认为是维持组织表型至关重要的样品的异质性本身，也使得对纯细胞群进行最终的生化分析及对它们的反应性的分析变得极其困难。

因此在最近几年，学者做了许多尝试，试图通过重新创造适宜的培养环境，在纯系细胞中再次诱导出分化表型，从而明确单个影响因素对诱导分化和维持分化的影响。通常通过让细胞停止分裂并产生出相互作用的、高密度的细胞群体来完成这样的工作，就像典型的组织或器官培养那样。细胞与细胞之间的相互作用在组织工程的建立中已变得至关重要（参见 19.7.1 节、20.4.1 节、20.4.2 节）。

19.4 定向和细胞谱系

从干细胞进入到特定分化途径的过程，通常意味着随着分化进程的发展，定向分化能力增强（参见图 2.6）。造血干细胞进入淋巴细胞性定向分化后，在随后的分化阶段就不会再改变细胞谱系，也不会再表达髓样细胞和红细胞的特性。同样，一个原始的神经外胚层干细胞，一旦定向成为神经元，就不会再变成神经胶质细胞。定向曾经被理解为是干细胞与特定前体细胞之间的临界点，过了这个临界点，单个细胞或它的后代就不能再转化成其他的细胞谱系。要是这种不可逆性定向存在的话，那么这个临界点必定比原来所预想的要出现得更晚，因为一些前体细胞能逆转成具有多细胞系分化潜能的细胞，如果进行适当的遗传或表观遗传操作，即使是完全成熟的细胞也能被逆转成干细胞状态（参见 19.5 节、26.5 节；短篇综述 26.2）。

关于细胞从一个细胞系转化为另一个细胞系的现象，过去有许多种说法。最能证实这些说法的是有关两栖类晶状体再生的细胞来自虹膜的研究（Clayton et al.，1980；Cioni et al.，1986）。由于虹膜可以充分分化并且仍旧可以再生出晶状体，因此这一说法被称为分化转化或转分化（transdifferentiation）。随着成熟细胞能被重编程后变成多能干细胞的例证出现（参见 19.5 节），现在看来完全可能利用合适的转录因子，直接把一个细胞系转变成另外一个细胞系而不必先把它逆转成干细胞（Vierbuchen et al.，2010）。分化转化可能发生在转化的细胞上，但是来自肿瘤和培养物的分化细胞表型的改变也可能有其他解释。例如，小细胞肺癌化疗后复发，就可以转化为鳞癌或大细胞癌。这是否就意味着一种细胞类型（如发生小细胞癌的 Kulchitsky 细胞）可以改变分化方向（de Leij et al.，1985），或者说肿瘤细胞最初来源于多潜能干细胞，而在复发时又进入了不同的分化途径，这些都还不清楚（Gazdar et al.，1983；Goodwin et al.，1983；Terasaki et al.，1984）。同样，晚期的退行性鳞状皮肤癌能长成间充质样细胞（Oft et al.，2002），这种被称为上

皮间充质转化（epithelial-mesenchymal transition）的现象已经在其他肿瘤中得到报道（Gregory et al.，2008），是肿瘤获得侵袭能力的重要因素。

K562 细胞系是从髓系白血病患者的血液中分离出来的，随后却发现该细胞还能向红细胞系分化（Andersson et al.，1979）。K562 不是作为一个定向髓系祖细胞转变为红细胞，这些肿瘤细胞可能来自普通的、可分化成红细胞和髓系细胞的干细胞。由于一些未知因素，连续的培养更容易使细胞向红细胞系分化而不再具有其来源的肿瘤细胞和早期培养时的髓系细胞特征。在一些情况下，肿瘤来源的培养细胞也会出现混合的表型。例如，C6 大鼠神经胶质瘤细胞同时表达星形胶质细胞和少突胶质细胞的特征，而这些特征也可以同时出现在相同的细胞中（Breen and de Vellis，1974）。

然而通常此类分化情况并不经常发生，这种情况仅限于肿瘤细胞的培养。大部分来源于正常组织的培养，虽然也可以向不同的方向分化，但不会转变为另外的分化细胞谱系。这就对正常组织来源的细胞株的真实状态提出了质疑。大部分培养的细胞来源于：①干细胞或早期祖细胞，这些细胞可以向一个或多个方向分化；②晚期前体细胞，它维持着正确的细胞谱系；③已分化的细胞，如纤维细胞，可去分化或增殖，但仍能保留原细胞谱系的特征（参见 2.7 节）。某些小鼠胚胎培养组织被笼统地称为成纤维细胞（如有多种被称为 3T3 的细胞系），可被诱导成为脂肪细胞、肌细胞及内皮细胞，当然还有纤维细胞，因此更恰当地说它们应该属于①类细胞。

把细胞系理解为一个由干细胞、前体细胞和分化的细胞（参见 2.7 节）共同组成的细胞群可能最为恰当，细胞之间的平衡通过环境中可溶的或接触性的介导信号来决定。在大多数繁殖细胞系中，大部分细胞将拥有前体细胞表型，但如果得到合适的信号，仍可以保持向干细胞或者向分化细胞表型转化的可塑性。

目前有一些详细描述的实例，在这些实例中，祖细胞（如脑中 O2A 普通的少突胶质细胞和大脑中Ⅱ型星形细胞的祖细胞，在 PDGF 和 bFGF 的混合培养基中仍然能够保持为可增殖的祖细胞）在缺乏生长因子或血清的条件下分化成少突胶质细胞，或者是在有胎牛血清或联合使用纤毛神经营养因子（CNTF）和 bFGF 时，分化成Ⅱ型星形胶质细胞（Raff et al.，1988；Raff，1990）。然而，当有 BMP 存在时，已经转化成少突胶质细胞的前体细胞仍能转化成一个普通的祖细胞表型（Kondo and Raff，2000，2004）。心肌细胞在血清和 bFGF 中保持未分化状态及增殖能力，无血清时就会分化（Goldman and Wurzel，1992）；原始胚胎干细胞在培养过程中能自发分化，除非在培养基中加入 bFGF、SCF（干细胞因子、Steel 因子、kit 配体）和 LIF（白血病抑制因子），才能停留在未分化、有增殖能力的阶段（Matsui et al.，1992）。

因此，随着成分更加明确的培养基的问世及更多分化诱导因子的鉴定，我们就有可能逐渐设计出正确的诱导环境，使细胞维持在干细胞样、祖细胞或者分化状态。

19.5 干细胞可塑性

传统的干细胞理论预测原始的干细胞越多，它的潜能就越大。单能性（unipotent）干细胞只能生成一种细胞谱系，例如，表皮基底层的干细胞，只能生成角化细胞。单胚层多能性（multipotent）干细胞将会生成两种以上细胞谱系，例如，骨髓里的原始血细胞可以生成粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨核细胞、肥大细胞和红细胞。多胚层多能性（pluripotent）干细胞能产生几个来自不同胚层的不同谱系（Smith，2006）。全能性（totipotent）干细胞，如胚胎干细胞（ESC），是唯一能生成各种细胞系的细胞（Mitalipov and Wolf，2009）。由于来自早期胚胎的内细胞团，ESC 具有全能性看起来也很合理。目前已经证实来自分化阶段的成熟细胞，如来自真皮的成纤维细胞，可以被

重编程形成被称为诱导多能性干细胞（induced pluripotent stem cell，iPSC）（Nakagawa et al.，2007；Yu et al.，2007；Aasen et al.，2008；Huangfu et al.，2008；Takahashi et al.，2007），这些细胞能分化形成几种不同的细胞谱系（参见图 2.7），其是否具有真正的全能性还有待观察。

在这里，单胚层多能性（multipotent）和多胚层多能性（pluripotent）在词源上具有相似的意思（multi＝many，pluri＝several），但在这节的上下文里，单胚层多能性还是专指一个谱系内的祖细胞（如造血系或神经系），它能在这个谱系的分支点上进行有限的选择性分化，如神经干细胞可以分化形成神经元、星形胶质细胞或者少突胶质细胞（图 2.8），而多胚层多能性一直被用来描述更原始的干细胞，它能分化成几个不相干的谱系（内胚层、中胚层、外胚层或者神经外胚层），更像是胚胎干细胞。

另一个传统的观念认为定向程度越高，干细胞的组织特异性就越强。例如，造血干细胞存在于骨髓内，肠上皮干细胞存在于小肠隐窝底部，角化上皮干细胞存在于表皮内。要是定向及组织学定位意味着潜能降低的话，那么诸如肝内的干细胞就应该只产生肝细胞（肝细胞、胆管细胞），而无法再生的组织也不可能拥有干细胞，如中枢神经系统的神经元。然而，谱系定向、潜能和组织定位这一明晰的概念现在正受到来自以下结果的质疑（Vescovi et al.，2002）：①不能再生的组织，如脑内的神经元，确实拥有干细胞（Pevny and Rao，2003）；②组织定位不一定意味着谱系定向和潜能降低，如肝干细胞能形成神经元（Deng et al.，2003），骨髓干细胞能分化成心肌（Mangi et al.，2003），肌肉干细胞能分化成造血干细胞（Cao et al.，2003），神经干细胞能分化成内皮细胞（Wurmser et al.，2004）。有些情况下，干细胞也会分化成未可预知的谱系，如骨髓细胞能形成肝细胞、心肌细胞或神经元（Alison et al.，2004；Alvarez-Dolado et al.，2003），这可能是由细胞融合引起的（Greco and Recht，2003），但另外的研究认为这样的分化与细胞融合无关（Wurmser et al.，2004）。受到后来 iPSC 的研究启示，这种情况更可能是由于当细胞从一个微环境龛（niche）被转到另一个微环境龛时，这些细胞被重新编程了。

成熟细胞转变成 iPSC 的重编程，目前需要诸如 *OCT4*、*NANOG* 和 *SOX2* 基因的转染（参见 26.3.7 节，短篇综述 26.2），但是化学调节物，如能通过抑制组蛋白脱乙酰酶而改变染色质重排的丙戊酸（2-丙基戊酸），能够降低诱导成 iPSC 所必需的转染基因的数量（Huangfu et al.，2008）。此外，分化中的少突胶质细胞前体细胞能被诱导分化并能逆转成多潜能的神经干细胞，后者用生长因子如 BMP、FGF-2 处理后，可以重新分化成成熟的星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元，再次表明细胞经过了染色质重建（Kondo and Raff，2004）。同样地，内皮素-3（endothelin-3）能诱导黑素细胞和施万细胞分化产生共同祖细胞，后者可以分化形成神经胶质和黑素细胞（Dupin et al.，2000，2003；Le Douarin et al.，2004）。这些研究结果引发了人们对最终不用具有潜在危害的基因进行转染就能获得 iPSC 的兴趣展望（Zhao and Daley，2008）。这些细胞不仅可以提供有价值的同种移植物用来移植和组织修复，同时当它们来源于遗传异常的人们时，也可提供细胞资源用来研究表型异常的发生机制，还可为高通量筛查（high-throughput screening, HTS）分析提供细胞资源（见短篇综述 26.2）。

19.6 分化标记物

分化早期表达并在随后的成熟过程中一直保留的标记物，一般被视为细胞谱系的标记物，包括中间丝蛋白诸如细胞角蛋白（上皮细胞）（Moll et al.，1982），或者胶质纤维酸性蛋白（星形胶质细胞）（Eng and Bigbee，1979；Bignami et al.，1980）。成熟细胞的标记物出现在终末分化的细胞上，通常是特异性细胞产物，或者是参与这些产物合成的酶，如红细胞中的血红蛋白、肝细胞

中的血清白蛋白、分化状态的角化细胞中的转谷氨酰胺酶（Schmidt et al.，1985）或被膜素（Parkinson and Yeudall, 1992），以及少突胶质细胞中的甘油磷酸脱氢酶（Breen and de Vellis, 1974）等（参见表 2.1）。这些特性通常在细胞谱系晚期表达，并且容易被逆转，同时受激素、营养素、基质成分和细胞间相互作用的适应性调控（图 19.1）。

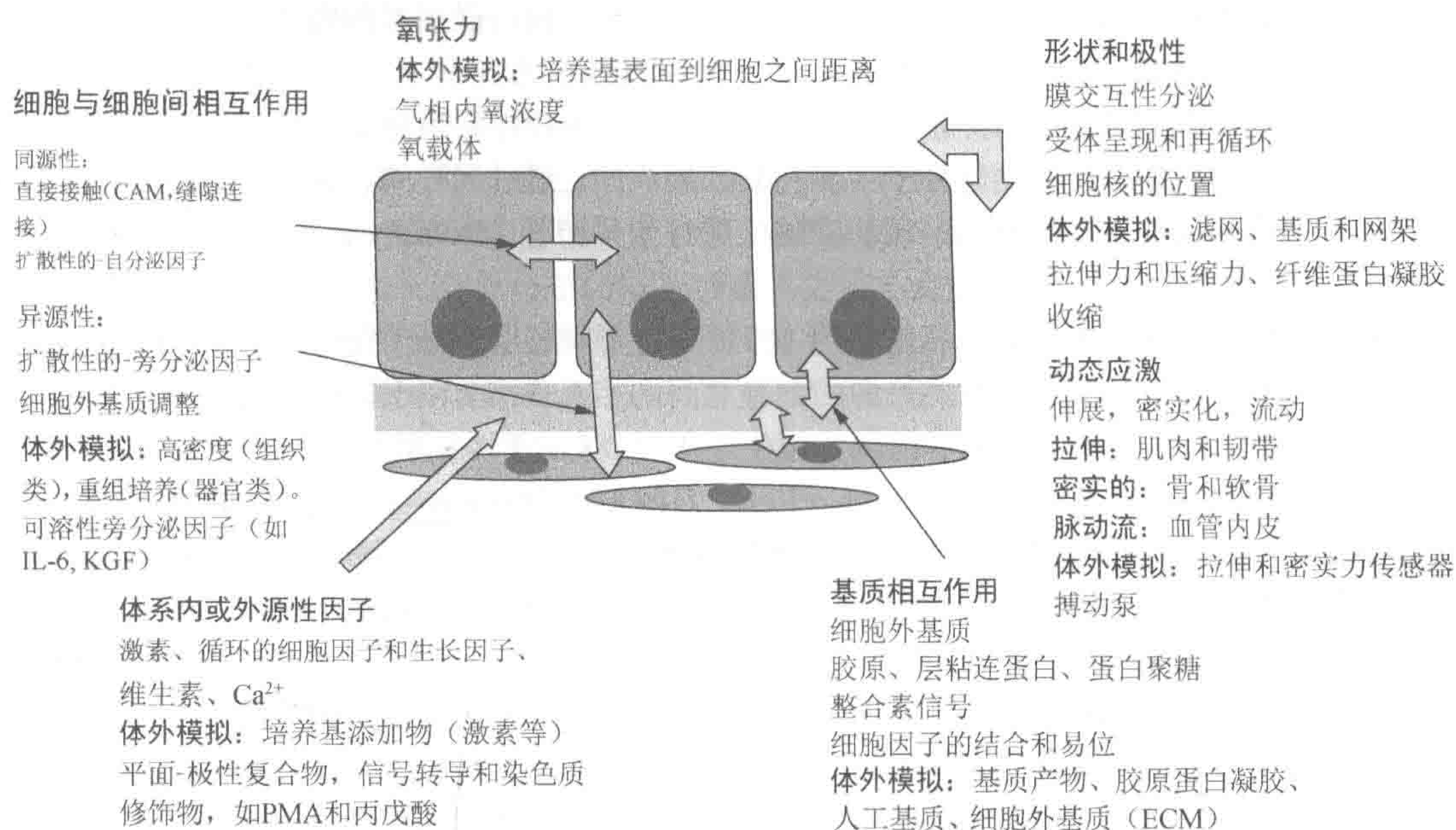


图 19.1 分化调节。分化表达的调控参数，以及在体外能重新形成分化调控的一些方式

能够编码大量分化产物的基因，目前已经被鉴定出来并进行了测序（IHGSC，2001），利用可以识别特异的 mRNA 表达的 RT-PCR（Ausubel et al.，2014）、微阵列分析（Kawasaki，2004）技术，就可能寻找到分化标记蛋白的表达（参见彩版 24a）。这种方法无法确定最终产物是否合成，但是可以区分出特异基因转录水平的极低表达（或者无表达）和高表达；由于可以同时检测多基因表达，同其他检测基因产物表达的方法相比具有很多优势。蛋白质组（proteome）是指与特异表型相关的全部相应的蛋白质，也可以用抗体芯片通过微阵列分析而获得。


彩版 24

分化应当被认为是与终末分化相关的一种或者更有可能是一种以上标记物的表达。虽然细胞谱系的标记物有助于确定细胞种类，但成熟细胞功能特性的表达是终末分化和确认细胞来源的最佳标准。

19.7 诱导分化

有许多环境因素能调控分化（图 19.1）：细胞与细胞之间的相互作用、细胞与基质之间的相互作用、细胞形状和极性、动态应激、氧张力、可溶性因子。这些因素可以独立调控分化也可以协同发生作用。体外模拟某些因素可能很简单，如添加激素或允许细胞达到某种高密度生长状态。但是其他的体外模拟就复杂得多，诸如在重建的血管上施加脉动流。

19.7.1 细胞相互作用

组织培养的初期，人们就已经明确了细胞之间的相互作用在维持或者启动分化中具有重要作

用。现在我们对细胞间的很多成分及其如何影响细胞分化有了更好的理解，这使得通过设计三维结构来重塑组织甚至整个器官已经成为可能（参见 20 章）。

同源性细胞　在细胞密度高的情况下，同源性细胞可以通过缝隙连接相互作用。代谢产物、第二信使（如环腺苷酸）、甘油二酯（DAG）、钙离子和电荷可以通过缝隙连接在细胞之间流通交换（Finbow and Pitts，1981；Hervé and Derangeon，2013）。在一群相似的细胞内部，这种相互作用很可能是协调分化表达，而非启动分化表达（另见 20.1 节）。

同型细胞间的黏附分子如 CAM 或钙黏蛋白（都是钙依赖性黏附分子）通过细胞接触提供了相互作用的另一种机制。这些黏附分子主要在相同细胞间，通过同样的、相互间的作用及胞外区域促进相互作用，还能通过细胞内区域的磷酸化进行信号转导（Doherty et al.，1991；Gumbiner，1995）。

异源性细胞　异源性细胞间的相互作用（即指来自不同胚层起源的细胞之间的相互作用，如中胚层来源的细胞与内胚层或外胚层来源的细胞之间的相互作用）在于启动并促进细胞分化。在胚胎原肠形成期间或一经形成及随后的器官发生过程中，来源于不同胚层的细胞相互作用促进了细胞分化（Yamada et al.，1991；Hirai et al.，1992；Hemmati-Brivaniou et al.，1994；Muller et al.，1997）。例如，当来自胚胎前肠的内胚层细胞形成憩室并在邻近的中胚层增殖时，中胚层细胞会诱导憩室形成肺泡和细支气管，并诱导其本身变成弹性组织（Hardman et al.，1990；Caniggia et al.，1991）。

这一过程在成体中持续存在至何种程度，目前还不清楚。但是来自表皮的成熟过程的证据表明，对于形成富含交联的角蛋白的角化鳞状上皮而言，由生长因子（如 KGF、GM-CSF）和细胞因子（如 IL-1α、IL-1β）介导的表皮层和真皮层之间的相互作用是必需的（图 19.2）（Maas-Szabowski et al.，2002），这个和其他组织的例子，如前列腺（Wong et al.，2003）都提示细胞之间的相互作用仍然是成体细胞维持分化状态的关键因素，在癌变发生过程中则这种作用消失。

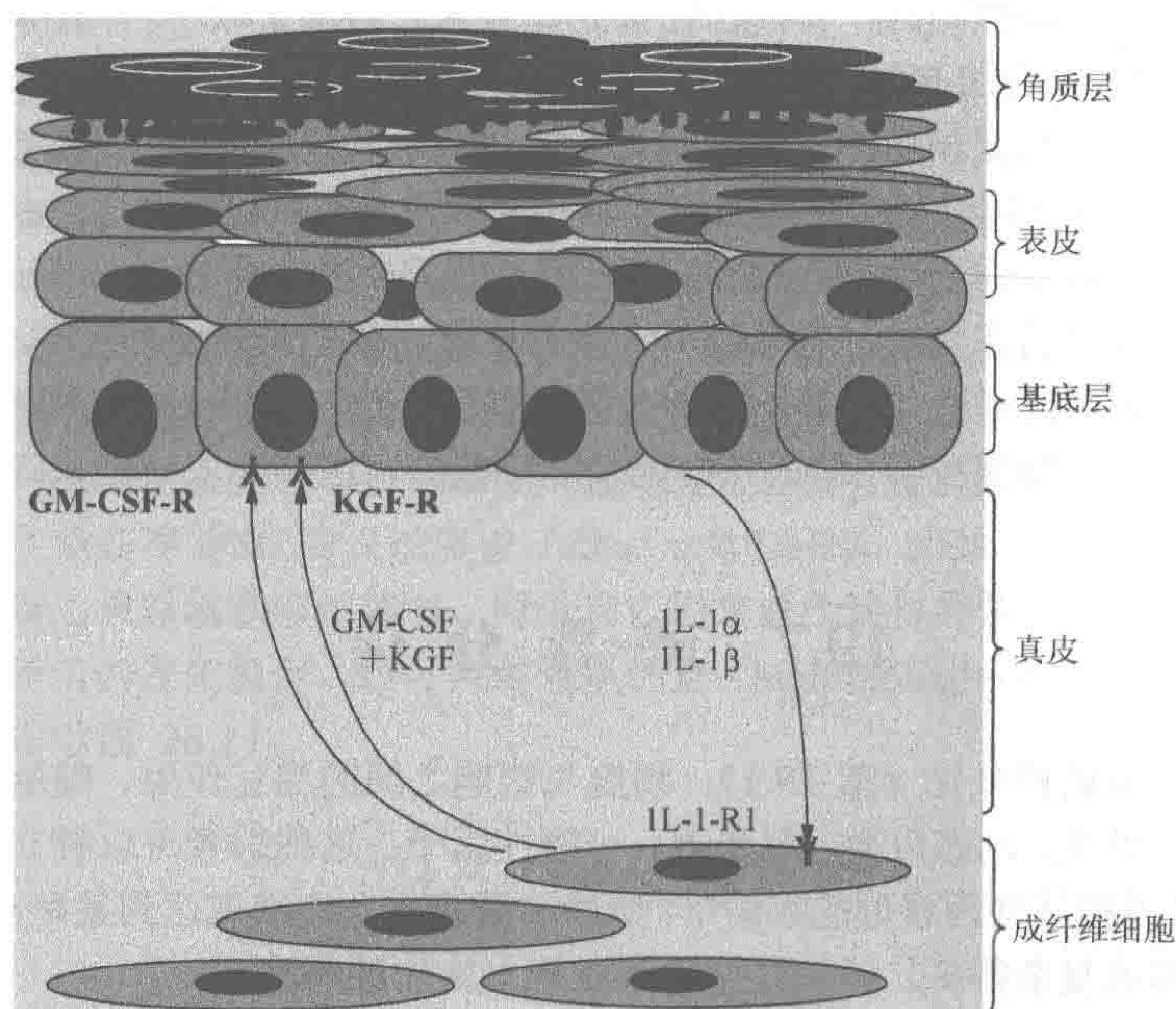


图 19.2　旁分泌因子间相互作用。图示：在器官型培养体系中与成纤维细胞共培养时，调节角化细胞生长的旁分泌因子通路，包括 IL-1、KGF、GM-CSF 及它们的受体（Maas-Szabowski et al.，2000；Szabowski et al.，2000）（节选自 Maas-Szabowski et al.，2002）

旁分泌生长因子


彩版12


彩版13

正向作用。来自于作用靶点以外的细胞系分泌的细胞因子为异源性（heterotypic）。旁分泌因子（参见2.5节），如前列腺的KGF（Planz et al.，1998）、肺内的肺泡成熟因子（Post et al.，1984），以及其他一些潜在的候选因子，例如，肺成熟过程中的IL-6和制瘤素M（oncostatin M）（McCormick et al.，1995；McCormick and Freshney，2000），脑内的神经胶质成熟因子（Keles et al.，1992）（参见19.7.1节，彩版12d，彩版13e、f），肾脏里的干扰素（例如，Pfeffer and Eisenkraft，1991）。

某些生长因子能起到形态发生源的作用（Gumbiner，1992），如上皮形成素（epimorphin）（Hirai et al.，1992；Radisky et al.，2003）和肝细胞生长因子/扩散因子（HGF/SF）（Kinoshita and Miyajima，2002）。HGF是肝素结合生长因子（HBGF）家族成员之一（参见表9.4），由成纤维细胞如MRC-5释放（Kenworthy et al.，1992）。上皮形成素和HGF能诱导来源于狗肾的永久细胞系MDCK（Orellana et al.，1996；Montesano et al.，1991）、唾液腺上皮（Furue and Saito，1997）和乳腺上皮（Soriano et al.，1995）形成导管。KGF也是一种旁分泌因子，由真皮层和前列腺的成纤维细胞产生，它能诱导表皮（Aaronson et al.，1991；Gumbiner，1992）和前列腺上皮形成（Planz et al.，1998；Thomson et al.，1997）。FGF-1、FGF-2、FGF-3，KGF（FGF-7），TGF-β和激活素（activin）等生长因子在胚胎诱导中也具有活性作用（Jessell and Melton，1992）。

HGF和KGF都只由成纤维细胞产生，也都是典型的旁分泌生长因子，只与其他细胞（主要是上皮细胞）表面的受体结合。在某些情况下，旁分泌因子的释放受全身激素水平的调控。肺内Ⅱ型肺泡细胞对地塞米松的反应是产生表面活性物质，这一现象已被体内实验所证实。体外实验显示，类固醇与基质受体结合，随后基质释放一种多肽激活肺泡细胞，从而诱导肺泡细胞合成表面活性物质（Post et al.，1984）。同样，小鼠前列腺上皮细胞对雄激素的反应也受基质的调节（Thomson et al.，1997）。已经证实在前列腺中至少KGF是参与相互作用的一种成分（Yan et al.，1992）。

氢化可的松可刺激小肠上皮细胞分化，这种分化也要求其下面有基质成纤维细胞存在（Kédinger et al.，1987），这个例子说明了两种细胞间的相互作用是通过细胞外基质调节的（Simon-Assman et al.，1986），地塞米松依赖的基质调节作用也体现在Ⅱ型肺泡细胞对旁分泌因子的反应方面（参见19.7.1节）（Yevdokimova and Freshney，1997）。造血系统的分化受几种细胞谱系特异性生长因子的正向调控，这些生长因子包括IL-1、IL-6、G-CSF和GM-CSF等（参见表9.4，图26.7；短篇综述25.1），其中最后一个即GM-CSF的激活也有赖于基质（de Wynter et al.，1993）。基质硫酸肝素也参与FGF的激活过程（Klagsbrun and Baird，1991；Ferning and Gallagher，1994）。

负向作用。负向作用因子如MIP-1α维持干细胞表型（Graham et al.，1992），同样，PDGF和FGF-2促进O2A祖细胞的生长和自我更新，却限制它的分化（Bŏgler et al.，1990）。其他分化的负向调节剂还包括参与ESC分化的LIF（Smith et al.，1988）和参与Ⅱ型肺泡细胞分化的TGF-β（Torday and Kourembanas，1990；McCormick and Freshney，2000；McCormick et al.，1995）。

19.7.2 全身性因子

生理性诱导剂（表19.1）诱导分化的全身性生理性诱导剂包括如下几种。

（1）*激素*。在体内由某一组织或器官分泌，通过血液循环到达受体器官，如内分泌因子，这类诱导剂有氢化可的松、胰高血糖素和甲状腺素（或三碘甲腺原氨酸）。

表 19.1 可溶性分化诱导剂：生理性的

诱导剂	细胞类型	参考文献
类固醇及相关		
氢化可的松	神经胶质细胞，神经胶质瘤	McLean et al.，1986
	Ⅱ型肺泡细胞	Rooney et al.，1995；McCormick et al.，1995
	肝细胞	Granner et al.，1968
	乳腺上皮	Marte et al.，1994
	髓样白血病	Sachs，1978
类视黄醇	气管支气管上皮	Kaartinen et al.，1993
	内皮	Lechardeur et al.，1995；Hafny et al.，1996
	肠上皮细胞（Caco-2）	McCormack et al.，1996
	胚胎瘤	Mills et al.，1996
	黑色素瘤	Lotan and Lotan，1980；Meyskens and Fuller，1980
	髓样白血病	Degos，1997
	神经母细胞瘤	Ghigo et al.，1998
肽类激素		
促黑激素	黑素细胞	Goding and Fisher，1997
促甲状腺素	甲状腺	Chambard et al.，1987
促红细胞生成素	成红细胞	Goldwasser，1975
泌乳素	乳腺上皮	Takahashi et al.，1991；Rudland，1992；Marte et al.，1994
胰岛素	乳腺上皮	Marte et al.，1994；Rudland，1992
细胞因子		
神经生长因子	神经元	Levi-Montalcini，1966
神经胶质成熟因子、CNTF、PDGF、BMP2	神经胶质细胞	Keles et al.，1992；Raff，1990；Kondo and Raff，2000，2004
上皮形成素	肾上皮	Hirai et al.，1992
纤维细胞-肺上皮细胞因子	Ⅱ型肺泡细胞	Post et al.，1984
干扰素-α，β	A549 细胞	McComick et al.，1995
	HL60，髓样白血病	Kohlhepp et al.，1987
干扰素-γ	神经母细胞瘤	Wuarin et al.，1991
CNTF	Ⅱ型星形胶质细胞	Raff，1990
IL-6，OSM	A549 细胞	McCormick et al.，1995；McCormick and Freshney，2000
BMP	10T1/2	Shea et al.，2003
KGF	角化细胞	Aaronson et al.，1991
	前列腺上皮	Thomson et al.，1997；Yan et al.，1992
HGF	肾（MDCK）	Bhargava et al.，1992；Li et al.，1992
	肝细胞	Montesano et al.，1991
TGF-β	支气管上皮，黑素细胞	Masui et al.，1986a；Fuller and Meyskens，1981
内皮素	黑素细胞	Aoki et al.，2005
维生素		
维生素 E	神经母细胞瘤	Prasad et al.，1980
维生素 D_3	单核细胞（U937）	Yen et al.，1993
	骨髓瘤	Murao et al.，1983
	成骨细胞	Vilamitjana-Amedee et al.，1993
	肠上皮细胞（IEC-6）	Jeng et al.，1994
维生素 K	肝细胞瘤	Bouzahzah et al.，1995
	肾上皮	Cancela et al.，1997
类视黄醇（参见本表前面）		
矿物质		
Ca^{2+}	角化细胞	Boyce and Ham，1983

（2）维生素。如维生素 D_3（Jeng et al.，1994；Rattner et al.，1997）和视黄酸（Saunders et al.，1993；Hafny et al.，1996；Ghigo et al.，1998），它们均来自于饮食，进一步在体内经生物代谢进行修饰。

（3）无机离子。尤其是钙离子，高浓度的钙离子能促进角质形成细胞的分化（Cho and Bikle，1997）（如见 25.2.1 节，方案 25.1-Su），这可能与钙离子的生理功能相关（钙黏蛋白具有钙依赖性），如在细胞间相互作用、细胞内信号转导，以及在同一细胞类型间通过细胞膜的钙脉冲（所谓的钙波）将信号从应答细胞传到邻近细胞等过程中，钙离子均发挥重要的作用（图 2.9），并与缝隙连接及可能的全分泌因子、硫酸肝素一起协调作用发生应答反应。

其他生理性诱导剂，如旁分泌因子（参见 19.7.1 节）则不需要血液循环运输，直接在邻近的细胞间发挥作用，但其中有一些因子（如 FGF、PDGF 及白细胞介素）在血液中也可检测到，因此它们也在一定程度上发挥全身性作用。

非生理性诱导剂 Rossi 和 Friend 在 1967 年就观察到用二甲基亚砜（DMSO）处理小鼠红白血病细胞可诱导 Friend 白血病病毒的产生，细胞变红是因为细胞产生了血红蛋白（见彩版 13a、b），这通过球蛋白基因表达升高得到了确定（Conkie et al.，1974）（见彩版 13c、d）。随后发现许多其他细胞（如神经母细胞瘤、骨髓瘤、乳腺癌等肿瘤的细胞）也会对 DMSO 发生反应而分化（参见 2.4.1 节、25.2.6 节、22.2.7 节）。现在又发现了许多其他化合物也属于非生理性诱导剂，如环己二乙酰胺（HMBA）、*N*-甲基乙酰胺、丁酸钠、苯二氮（其作用与 DMSO 相关），以及一些细胞毒药物，如氨甲蝶呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷和丝裂霉素 C 等（表 19.2）。丁酸钠也是一种非生理性分化诱导剂，但研究发现在肠中该物质自然地调节肠上皮细胞分化（Häner et al.，2010）。


彩版 13

表 19.2 可溶性分化诱导剂：非生理性的

诱导剂	细胞类型	细胞结局	参考文献
平面极性化合物			
DMSO	鼠红白血病	不成熟红细胞	Rossi and Friend，156；Dinen and Ebisuzaki，37
	骨髓瘤	粒细胞	Tarella et al.，177
	神经母细胞瘤	神经元	Kimhi et al.，93
	乳腺上皮	分泌性上皮细胞	Rudland，157
	肝细胞前体细胞，HepaRG 肝癌	肝细胞	Mitaka et al.，128；Hino et al.，77；Gripon et al.，65
丁酸钠	红白血病	不成熟红细胞	Andersson et al.，5
	结肠癌	吸收性上皮细胞	Häner et al.，72
N-甲基乙酰胺	胶质瘤	星形胶质细胞	McLean et al.，125
N-甲基甲酰胺，二甲基甲酰胺	结肠癌	吸收性上皮细胞	Dexter et al.，36
HMBA	红白血病	不成熟红细胞	Osborne et al.，138；Marks et al.，117
叔丁基羟基茴香醚	脂肪来源干细胞	神经元	Safford and Rice，159
苯二氮	红白血病	不成熟红细胞	Clarke and Ryan，26
细胞毒药物			
三羟基异黄酮	红白血病	不成熟红细胞	Watanabe et al.，190
阿糖胞苷	髓样白血病	粒细胞	Takeda et al.，176
丝裂霉素 C，蒽环类	黑色素瘤	黑素细胞	Raz，154
氨甲蝶呤	结直肠癌	吸收性或黏液分泌性上皮细胞	Lesuffleur et al.，106

续表

诱导剂	细胞类型	细胞结局	参考文献
组蛋白乙酰化			
丙戊酸	脂肪来源干细胞	神经元	Safford and Rice，159
	PC12 细胞系	神经突起延伸	Kamata et al.，85
	激活素 A 和 DMSO 处理的 iPSC	肝细胞标记物	Kondo et al.，101
	骨髓干细胞		
		Runx2，Osterix；骨钙素	Fu et al.，49
异羟肟酸 [SAHA;伏立诺他 (Vorinostat Zolinza)]	T 淋巴细胞		Marks and Breslow，116
苯基丁酸钠	肝癌细胞 Bel-7402	E-钙黏蛋白, P21 (WAL1/CIP1)	Wang et al.，189
川芎嗪	神经母细胞瘤 SH-SY5Y	神经突延伸，MAP2，Tau	Yan et al.，199
DNA 甲基化			
氮杂胞苷	NG108-15 神经细胞	胆碱能神经元	Aizawa et al.，3
	内皮祖细胞	心肌细胞	López-Ruiz et al.，109
信号转导修饰剂			
异丁基甲基黄嘌呤	脂肪来源干细胞	脂肪细胞	Safford and Rice，159
Forskolin	脂肪来源干细胞	神经元	Safford and Rice，159
PMA	支气管上皮	鳞状上皮	Willey et al.，192；Masui et al.，1986b
	乳腺上皮		Wada et al.，187
	结肠（HT29，Caco-2）	导管形态发生	Velcich et al.，181；Pignata et al.，144
	单核细胞白血病（U937）	单核细胞	Hass et al.，74
	红白血病（K562）	不成熟红细胞	Kujoth and Fahl，102
	神经母细胞瘤	神经突分枝	Soinelli et al.，171

缩略词：HMBA. 环六亚甲基双乙酰胺（hexamethylene bisacetamide）；PMA（TPA）. 豆蔻酸佛波醇乙酸酯（phorbol myristate acetate）

这些非生理性诱导剂的作用还不清楚，但可能是通过改变细胞膜的流动性（尤其是极性溶剂，如 DMSO、麻醉剂和镇静剂），或者作为信号转导酶的脂质嵌合剂而发挥作用，如蛋白激酶 C（PKC）和磷酸酯酶 D（PLD）（这两种酶被激活后就会重新定位，从可溶性的细胞质中转移到内质网上）；或者通过改变 DNA 的甲基化（Laurent et al.，2010）或组蛋白的乙酰化（Keenen and de la Serna，2008；Marks and Breslow，2007）而发挥作用，如 5-氮杂胞苷（Aizawa et al.，2009）及丙戊酸（Safford and Rice，2007；Huangfu et al.，2008）（表 19.2）。极性溶剂如 DMSO 诱导的分化，细胞表型可以保持正常，但是用细胞毒药物进行诱导分化时，有可能诱导出与分化无关的基因表达（Mclean et al.，1986）。

现已证实肿瘤促发剂如佛波酯（PMA）可以诱导支气管黏膜向鳞状上皮分化，但在支气管癌中未发现这种现象（Willey et al.，1984；Mascui et al.，1986a，1986b；Saunders et al.，1993）。虽然这些肿瘤促发剂并非体内正常的调节因子，但是它们可以结合特异性受体，通过 PKC 等物质的激活来激活信号转导过程（Dotto et al.，1985）。

19.7.3 细胞-基质相互作用

大部分细胞表面都环绕在糖蛋白和蛋白聚糖形成的复杂混合物中，这种混合物具有高度的组

织特异性，甚至同一组织的不同部分其特异性也不同（Hynes , 2009；Gattazzo et al.，2014）。在构建皮肤替代物（Boehnke et al.，2007）及维持干细胞池（Muffler et al.，2008）的过程中，再造这种涉及细胞之间及细胞与基质间相互作用的复杂的微环境，已经被证实是至关重要的（参见25.2.1 节）。许多上皮细胞的功能表达（Burwen and Pitelka，1980；Flynn et al.，1982；Berdichevsky et al.，1992）和内皮细胞成熟为毛细血管（Folkman and Haudenschild，1980）的过程中，胶原是至关重要的。基质分子中的 RGD 基序（精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸）是介导基质分子和受体相互作用的肽序列（Yamada and Geiger，1997），含有这个序列的小分子多肽可以有效地阻断基质诱导的分化，这就意味着完整的基质分子是分化所必需的（Pignatelli and Bodmer，1988）。

用合成的大分子模拟基质的作用已取得部分成功：在神经元的培养中，多聚右旋赖氨酸可促进神经突起的延伸（参见 25.4.1 节），但是在基质相互作用的特异性方面还需要进行大量的研究。单独用电荷不足以模拟更为复杂的信号，而这些更为复杂的信号已被证实存在于不同类型的基质相互作用中，但是电荷的改变能使细胞贴壁和延伸，而在此条件下，细胞就能产生自己的基质。

已经证实，内皮细胞（Kinsella et al.，1992；Garrido et al.，1995）和许多上皮细胞（Kibbey et al.，1992；Darcy et al.，1995；Venkata subramanian et al.，2000；Portnoy et al.，2004）在人工基底膜（Matrigel）上能够更有效地分化。Matrigel 是 EHS 肉瘤产生的基质物质，主要由层粘连蛋白组成，还含有胶原和蛋白聚糖。许多细胞系如肺腺癌细胞系 A549 在 Matrigel 上培养时会出现明显的分化（见彩版 12c）。这是一项很有用的技术，但是具有将其他生物性可变因素引入该培养体系的缺点。虽然纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原和其他一些基质成分可以商购得到，但仍需研发更多成分明确的基质，因为基质的特异性在很大程度上取决于蛋白聚糖部分，而此成分有很大的可变性，尤其体现在数量、类型和硫酸黏多糖如硫酸肝素所占比例等方面（Gallagher，2012）。


彩版 12

细胞外基质也在调节生长因子活性方面起到了重要作用。有人提出蛋白聚糖，尤其是硫酸肝素蛋白聚糖（HSPG）可以结合特定的生长因子如 GM-CSF（Luikart et al.，1990），使它们更容易被邻近的细胞摄取。肝素也能延长 FGF-1 的半衰期（Damon et al.，1989）。跨膜的 HSPG 也是生长因子的低亲和力受体，可以将结合的生长因子转给高亲和力受体（Klagsbrun and Baird，1991；Fernig and Gallagher，1994）。举例来说，A549 需要借助糖皮质激素对分化诱导剂（如 OSM、IL-6 和含有肺成纤维细胞的条件培养基）发生反应才能被诱导分化，糖皮质激素地塞米松诱导 A549 细胞产生低电荷密度的硫酸肝素片段，而该片段被部分纯化后可以替代地塞米松激活 OSM、IL-6 和含成纤维细胞的条件培养基（Yevdokimova and Freshney，1997），诱导 A549 细胞分化。

19.7.4 极性和细胞形状

对肝细胞的研究（Sattler et al.，1978）显示，细胞若要完全成熟就要求细胞生长在胶原凝胶上，随后还要借助于刮刀或弯曲的巴斯德管，将凝胶从培养皿底部取出。这一过程使得凝胶收缩，细胞形状发生改变，由扁平状变成立方形甚至是柱状。伴随细胞形状的改变或改变之后，也可能是由于通过凝胶接触到培养基，细胞逐渐显示出极性，这在电子显微镜下可以观察到；当细胞核不再对称分布，而是靠近细胞底部时，可见活化的高尔基复合体形成并向细胞顶部分泌。

用滤网小室装置（filter well assembly）在甲状腺上皮中找到了有关极性的类似证据（Chambard et al.，1987）。在这个例子中，甲状腺上皮的基底面产生促甲状腺素（TSH）受体并分泌三碘甲腺原氨酸，细胞顶部则释放甲状腺球蛋白。对肝细胞（Guguen-Guillouzo and Guillouzo，1986）（参见 25.2.6 节）和支气管上皮细胞（Saunders et al.，1993）的研究提示，流动的胶原可能不是很重要，而滤网小室培养法的成功（参见 20.3.9 节）证实从底部接触培养基有助于细胞极性形成。

19.7.5 动态应激

某些细胞类型需要动态应激来诱导和维持分化（参见2.4.1节），例如，用来诱导和维持分化为骨骼肌的张力应激、心肌的周期性应激、内皮的脉动流、骨及软骨的密实化应激等。建立这样的体外模型涉及非常复杂的力学信号转导装置（Vunjak-Nowakovic and Frshney，2006；Majkut et al.，2014）。

19.7.6 氧张力

在器官型构建培养体系内，皮肤完全角化的鳞状上皮的表达需要表皮细胞在气/液界面合适地定位（Maasazabowski et al.，2002），同理，Ⅱ型肺泡细胞的成功分化也需要该细胞在气/液界面定位（Speirs et al.，1991；Dobbs et al.，1997），气管上皮细胞只有在气/液界面才能分泌黏液，而若在培养皿底部生长就会鳞状化（Kaartinen et al.，1993；Paquette et al.，2003）。可能的原因是若细胞定位在气/液界面，更有利于气体交换，尤其是能在不增加局部压力的情况下摄入更多的氧，这样就避免了自由基损伤。不过，也可能是因为那层薄的气/液膜模拟了体内的理化环境（表面张力、缺少营养）和氧浓度，因此在上层添加D-PBSA能够优化培养基（Chambard et al.，1983，1987）。

19.8 分化和恶性

我们经常观察到，随着癌症的进展，肿瘤组织的分化程度越来越低。从预后的角度来看，同高分化肿瘤患者相比，低分化肿瘤患者生存率比较低。我们也已经明确癌症主要是因为细胞不能正常分化。因此，在组织培养中有许多生长的肿瘤能够被诱导分化，这一发现非常令人惊讶（表19.2）。确实，许多有关细胞分化的基本资料都来自于Friend小鼠白血病、人和鼠的骨髓瘤、肝细胞瘤和神经母细胞瘤。然而，分化特性的表达和恶性相关特性的表达看起来呈负相关，甚至这种负相关达到了一定程度，以至诱导分化经常被推荐作为肿瘤治疗的模型（Spremulli and Dexter，1984；Freshney，1985；Marks and Breslow，2007；Piccirillo et al.，2006；Wang et al.，2008；Kang et al.，2014）。有结果显示当单一的畸胎癌细胞种植到胚胎上时可以长成良性组织（Kleinsmith and Pierce，1964），这提示在转化的细胞中表型改变是可逆的。

19.9 应　　用

很明显，给予正确的环境条件，并假设有合适的细胞，在培养中就能得到部分分化，甚至完全分化的细胞。作为促进分化、对抗增生繁殖的常规方法，我们建议如下。

（1）利用合适的分离条件和选择性培养基筛选正确的细胞类型（参见9.2.2节，第25章，表25.1）。

（2）让细胞在合适的基质上高密度（$>1\times10^5$个/cm^2）生长。基质可以是适合于细胞组织来源的某种胶原，添加或不添加纤连蛋白或层粘连蛋白；或者是组织来源或细胞来源的（参见方案7.1）、成分更为复杂的基质，如人工基质（Matrigel）（参见19.7.3节）或合成基质（如培养神经

元用的多聚右旋赖氨酸)。

(3)将细胞换到分化培养基中培养,比在增殖培养基中培养效果更好。例如,培养上皮细胞,可将钙离子浓度提高到 3mmol/L 左右;培养支气管黏膜上皮,可以提高血清浓度(参见方案25.9-Su)。对于其他类型的细胞,这一步就要求明确哪些生长因子适合维持细胞增殖,哪些可以诱导分化。

(4)针对不同类型的细胞,添加合适的分化诱导因子,诸如糖皮质激素、类视黄醇、维生素 D_3、DMSO、HMBS、前列腺素,以及细胞因子如 bFGF、EGF、KGF、HGF、IL-6、OSM、TGF-β、干扰素、NGF、黑素细胞刺激激素(MSH)等(表 19.1、表 19.2)。

(5)在生长阶段(上述第 2 步)、诱导分化阶段(上述第 3、4 步)或这两个阶段加入相互作用的细胞类型。我们常常不知道该如何选择正确的细胞类型,但还是有一些比较好的典型例子,如肺上皮细胞成熟培养就选择肺成纤维细胞(Post et al., 1984; Speirs et al., 1991),神经元成熟培养就选择神经胶质细胞(Seifert and Müler, 1984),培养造血细胞就选择骨髓间质细胞等(Weiss, 1976; Schwartz and Greenberg, 1981; Dexter et al., 1984; Spooncer et al., 1992)。

(6)将培养基加到滤网小室中(例如,见 Chambard et al., 1983; Speris et al., 1991)提高培养的方法也有一定的优势,尤其是对特定的上皮细胞的培养更是如此,因为通过调整其上面培养基的成分和深度,滤网小室可以提供一个通路便于基底面细胞接触营养物质并结合配体,促进细胞极性形成,同时调节细胞上表面营养物质和氧的浓度。

以上所有因素在培养中并非都是必需的,而且以上顺序也是按其重要性优先排列。培养时间的长短也很重要,例如,一般情况下基质扩散得很慢,因此诱导分化时有必要延长暴露于基质的时间;而相对较短的暴露时间,某些激素就能发挥作用。此外,对激素、细胞因子和其他诱导剂的反应还有赖于是否存在合适的细胞外基质、细胞密度、异源性细胞的相互作用,以及其他可溶性因子的存在与否。例如,BMP4 能促进成骨细胞分化为骨(Wada et al., 1998; Carreira et al., 2014)并且利于胶质母细胞瘤转化的逆转和诱导分化(Piccirillo et al., 2006),但是 BMP4 可逆转少突胶质前体细胞的分化(Kondo and Raffle, 2000),并能抑制 mESC 分化(Smith et al., 1988; Ying et al., 2003)。有研究表明经 BMP4 诱导的细胞移植到发育中胚胎的背侧或外侧神经管这两个不同部位时,则分别会促进或抑制软骨分化。背侧种植会诱导软骨分化,而外侧的植入则会抑制软骨分化,提示局部微环境在诱导分化中的重要性。糖皮质激素在低细胞密度时促进细胞增殖(参见 16.2.1 节)(Guner et al., 1977),但在高细胞密度时诱导细胞分化(McCormick et al., 1995)。微环境和合适细胞密度下细胞间相互作用的理想状态的确立,可能需要三维的培养模型,这样的模型将在下一章节里讨论(参见 20 章)。

参 考 文 献

Aaronson SA, Bottaro DP, Miki T, Ron D, Finch PW, Fleming TP, Ahn J, Taylor WG, Rubin JS (1991). Keratinocyte growth factor: A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. *Ann. NY Acad. Sci.* **638**:62–77.

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisúa Belmonte JCI (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**:276–284.

Aizawa S, Sensui N, Yamamuro Y (2009). Induction of cholinergic differentiation by 5-azacytidine in NG108-15 neuronal cells. *Neuroreport* **20**:157–160.

Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S (2004). Hepatic stem cells: From inside and outside the liver? *Cell Prolif.* **37**:1.

Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J., & Alvarez-Buylla, A.(2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**: 968–973.

Andersson LC, Jokinen M, Klein G, Nilsson K (1979). Presence of erythrocytic components in the K562 cell line. *Int. J. Cancer.* **24**:5–14.

Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, Yamazaki H, Yamane T, Panthier JJ, Kunisada T (2005). Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev. Dyn.* **233**:407–17.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) (2014). *Current protocols in molecular biology*. Hoboken, NJ: Wiley.

Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M, Taylor-Papadimitriou J (1992). Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: The role of the alpha 2 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **102**: 437–446.

Bhargava M, Joseph A, Knesel J, Halaban R, Li Y, Pang S, Golberg I, Setter E, Donovan MA, Zarnegar R, Faletto D, Rosen EM (1992). Scatter factor and hepatocyte growth factor activities, properties, and mechanism. *Cell Growth Differ.* **3**:11–20.

Bignami A, Dahl D, Rueger DG (1980). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in normal neural cells and in pathological conditions. In Federoff S, Hertz L (eds.), *Advances in cellular neurobiology*, Vol. **1**. New York: Academic Press.

Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P, Stark H-J (2007). Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur. J. Cell Biol.* **86**:731–746.

Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6368–6372.

Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D, Carr BI (1995). Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: Inhibitory actions of vitamin K. *J. Cell Physiol.* **165**:459–467.

Boyce ST, Ham RG (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**:33s–40s.

Breen GAM, De Vellis J (1974). Regulation of glycerol phosphate dehydrogenase by hydrocortisone in dissociated rat cerebral cell cultures. *Dev. Biol.* **41**:255–266.

Burwen SJ, Pitelka DR (1980). Secretory function of lactating mouse mammary epithelial cells cultured on collagen gels. *Exp. Cell Res.* **126**:249–262.

Cancela ML, Hu B, Price PA (1997). Effect of cell density and growth factors on matrix GLA protein expression by normal rat kidney cells. *J. Cell Physiol.* **171**:125–134.

Caniggia I, Tseu I, Han RN, Smith BT, Tanswell K, Post M (1991). Spatial and temporal differences in fibroblast behavior in fetal rat lung. *Am. J. Physiol. Lung Mol. Cell. Physiol.* **261**:L424–L433.

Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J (2003). Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat. Cell Biol.* **5**:640–646.

Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar M4, Granjeiro JM (2014). Bone morphogenetic proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.* 561:64–73. PMID: 25043976.

Chambard M, Mauchamp J, Chaband O (1987). Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: Modulation by thyrotropin. *J. Cell Physiol.* **133**:37–45.

Chambard M, Vemer B, Gabrion J, Mauchamp J, Bugeia JC, Pelassy C, Mercier B (1983). Polarization of thyroid cells in culture: Evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor–adenyl cyclase complex. *J. Cell Biol.* **96**:1172–1177.

Che Abdullah CA, Azad CL, Ovalle-Robles R, Fang S, Lima MD, Lepró X, Collins S, Baughman RH, Dalton AB, Plant NJ, Sear RP (2014). Primary liver cells cultured on carbon nanotube substrates for liver tissue engineering and drug discovery applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**(13):10373–10380.

Cho J-K, Bikle DD (1997). Decrease of Ca-ATPase activity in human keratinocytes during calcium-induced differentiation. *J. Cell Physiol.* **172**:146–154.

Cioni C, Filoni S, Aquila C, Bernardini S, Bosco L (1986). Transdifferentiation of eye tissue in anuran amphibians: Analysis of the transdifferentiation capacity of the iris of *Xenopus laevis* larvae. *Differentiation* **32**:215–220.

Clarke GD, Ryan PJ (1980). Tranquilizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induce differentiation in Friend cells. *Nature* **287**:160–161.

Clayton RM, Bower DJ, Clayton PR, Patek CE, Randall FE, Sime C, Wainwright NR, Zehir A (1980). Cell culture in the investigation of normal and abnormal differentiation of eye tissues. In Richards RJ, Rajan KT (eds.), *Tissue culture in medical research (II)*. Oxford, UK: Pergamon Press, pp. 185–194.

Conkie D, Affara N, Harrison PR, Paul J, Jones K (1974). In situ localization of globin messenger RNA formation. II. After treatment of Friend virus-transformed mouse cells with dimethyl sulfoxide. *J. Cell Biol.* **63**:414–419.

Damon DH, Lobb RR, D'Amore PA, Wagner JA (1989). Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *J. Cell Physiol.* **138**:221–226.

Darcy KM, Shoemaker SF, Lee P-PH, Vaughan MM, Black JD, Ip MM (1995). Prolactin and epidermal growth factor regulation of the proliferation, morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells in three dimensional primary culture. *J. Cell Physiol.* **163**:346–364.

de Wynter E, Allen T, Coutinho L, Flavell D, Flavell SU, Dexter TJ (1993). Localisation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human long-term bone marrow cultures. *J. Cell Sci.* **106**:761–769.

De Leij L, Poppema S, Nulend IK, Haar AT, Schwander E, Ebbens F, Postmus PE, The TH (1985). Neuroendocrine differentiation antigen on human lung carcinoma and Kulchitski cells. *Cancer Res.* **45**:2192–2200.

Degos L (1997). Differentiation in acute promyelocytic leukemia: European experience. *J. Cell Physiol.* **173**:285–287.

Deng J, Steindler DA, Laywell ED, Petersen BE (2003). Neural transdifferentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain. *Exp Neurol.* **182**:373–382.

Dexter TJ, Spooncer E, Simmons P, Allen TD (1984). Long-term marrow culture: An overview of technique and experience. In WrightDG, & Greenberger, J.S. (eds.), *Long-term bone marrow culture*. New York, Alan R. Liss, Kroc Foundation Series 18, pp. 57–96.

Dexter TM, Allen TD, Scott D, Teich N.M. (1979). Isolation and characterisation of a bipotential haematopoietic cell line. *Nature* **277**:417–474.

Dinnen R, Ebisuzaki K (1990). Mitosis may be an obligatory route to terminal differentiation in the Friend erythroleukemia cell. *Exp. Cell Res.* **191**:149–152.

Dobbs LG, Pian M, Dumars S, Maglio M, Allen L (1997). Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am. J Physiol.* **273**: L347–L354.

Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS (1991). Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca channels. *Cell* **67**:21–33.

Dotto GP, Parada LF, Weinberg RA (1985). Specific growth response of *ras*-transformed embryo fibroblasts to tumour promoters. *Nature* **318**:472–475.

Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, le Douarin NM (2000). Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7882–7887.

Dupin E, Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, le Douarin NM (2003). Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages, transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5229–-5233.

Eng LF, Bigbee JW (1979). Immunochemistry of nervous-system

specific antigens. In Aprison MH (ed.), *Advances in neurochemistry*. New York: Plenum Press, pp. 43–98.

Fernig DG, Gallagher JT (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: An information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Progress Growth Factor Res.* **5**:353–377.

Finbow ME, Pitts JD (1981). Permeability of junctions between animal cells. *Exp. Cell Res.* **131**:1–13.

Flynn D, Yang J, Nandi S (1982). Growth and differentiation of primary cultures of mouse mammary epithelium embedded in collagen gel. *Differentiation* **22**:191–194.

Folkman J, Haudenschild C (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**:551–556.

Freshney RI (1985). Induction of differentiation in neoplastic cells. *Anticancer Res.* **5**:111–130.

Fu Y, Zhang P, Ge J, Cheng J, Dong W, Yuan H, Du Y, Yang M, Sun R, Jiang H (2014). Histone deacetylase 8 suppresses osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by inhibiting histone H3K9 acetylation and RUNX2 activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**:68–77.

Fuller BB, Meyskens FL (1981). Endocrine responsiveness in human melanocytes and melanoma cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**:799–802.

Furue M, Saito S (1997). Synergistic effect of hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor-1 on the branching morphogenesis of rat submandibular gland epithelial cells. *Tissue Cult. Res. Commun.* **16**:189–194.

Gallagher JT (2012). Heparan sulphate: A heparin in miniature. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2012**(207):347–360.

Garrido T, Riese HH, Aracil M, Perez-Aranda A (1995). Endothelial cell differentiation into capillary-like structures in response to tumour cell conditioned medium: A modified chemotaxis chamber assay. *Br. J. Cancer* **71**:770–775.

Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P (2014). Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**:2506–2519.

Gazdar AF, Carney DN, Minna JD (1983). The biology of nonsmall cell lung cancer. *Semin. Oncol.* **10**:3–19.

Ghigo D, Priotto C, Migliorino D, Geromin D, Franchino C, Todde R, Costamagna C, Pescarmona G, Bosia A (1998). Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis. *J. Cell Physiol.* **174**:99–106.

Goding CR, Fisher DE (1997). Meeting review—regulation of melanocyte differentiation and growth. *Cell Growth Differ.* **8**:935–940.

Goldman BI, Wurzel J (1992). Effects of subcultivation and culture medium on differentiation of human fetal cardiac myocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**:109–119.

Goldwasser E (1975). Erythropoietin and the differentiation of red blood cells. *Fed. Proc.* **34**:2285–2292.

Goodwin G, Shaper JH, Abezoff MD, Mendelsohn G, Baylin SB (1983). Analysis of cell surface proteins delineates a differentiation pathway linking endocrine and nonendocrine human lung cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3807–3811.

Graham GJ, Freshney MG, Donaldson D, Pragnell IB (1992). Purification and biochemical characterisation of human and murine stem cell inhibitors. *Growth Factors* **7**:151–160.

Granner DK, Hayashi S, Thompson EB, Tomkins GM (1968). Stimulation of tyrosine aminotransferase synthesis by dexamethasone phosphate in cell culture. *J. Mol. Biol.* **35**:291–301.

Greco B, Recht L (2003). Somatic plasticity of neural stem cells: Fact or fancy? *J. Cell. Biochem.* **88**:51–56.

Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* **7**:3112–3118.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(24):15655–15660.

Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (1986). Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (eds.), *Isolated and cultured hepatocytes*. Paris: Les Éditions INSERM, John Libbey Eurotext, pp. 1–12.

Gumbiner B. (1992). Epithelial morphogenesis. *Cell* **69**:385–387.

Gumbiner BM, Yamada KM (1995). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:615–618.

Guner M, Freshney RI, Morgan D, Freshney MG, Thomas DGT, Graham DI (1977). Effects of dexamethasone and betamethasone on *in vitro* cultures from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **35**:439–447.

Hafny BEL, Bourre J-M, Roux F (1996). Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalised rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **167**:451–460.

Halaban R (2004). Culture of melanocytes from normal, benign, and malignant lesions. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 289–318.

Häner K, Henzi T, Pfefferli M, Künzli E, Salicio V, Schwaller B (2010). A bipartite butyrate-responsive element in the human calretinin (CALB2) promoter acts as a repressor in colon carcinoma cells but not in mesothelioma cells. *J. Cell. Biochem.* **109**:519–531.

Hardman P, Klement BJ, Spooner BS (1990). Growth and morphogenesis of embryonic mouse organs on Biopore membrane. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:119–120.

Hass R, Gunji H, Hirano M, Weichselbaum R, Kufe D (1993). Phorbol ester-induced monocytic differentiation is associated with G2 delay and down regulation of cdc25 expression. *Cell Growth Differ.* **4**:159–166.

Hemmati-Brivaniou A, Kelly OG, Melton DA (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**:283–295.

Hervé JC, Derangeon M (2013). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res.* **352**(1):21–31.

Hino H, Tateno C, Sato H, Yamasaki C, Katayama S, Kohashi T, Aratani A, Asahara T, Dohi K, Yoshizato K (1999). A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**:184–189.

Hirai Y, Takebe K, Takashina M, Kobayashi S, Takeichi M (1992). Epimorphin: A mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* **69**:471–481.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S-B, Muhlestein W, Melton DA (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**:1269–1275.

Hynes RO (2009). The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science* **326**:1216–1219.

IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium) (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860–921.

Jeng Y-J, Watson CS, Thomas ML (1994). Identification of vitamin D-stimulated phosphatase in IEC-6 cells, a rat small intestine crypt cell line. *Exp. Cell Res.* **212**:338–343.

Jessell TM, Melton DA (1992). Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* **68**:257–270.

Kaartinen L, Nettesheim P, Adler KB, Randell SH (1993). Rat tracheal epithelial cell differentiation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**:481–492.

Kamata Y, Shiraga H, Tai A, Kawamoto Y, Gohda E (2007). Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid. *Neuroscience* **146**:1073–1081.

Kang TW, Choi SW, Yang SR, Shin TH, Kim HS, Yu KR, Hong IS,

Ro S, Cho JM, Kang KS (2014). Growth arrest and forced differentiation of human primary glioblastoma multiforme by a novel small molecule. *Sci. Rep.* **4**:5546.

Kawasaki ES (2004). Microarrays and the gene expression profile of a single cell. *Ann NY* Acad *Sci.* **1020**:92–100.

Kédinger M, Simon-Assmann P, Alexandre E, Haffen K (1987). Importance of a fibroblastic support for *in vitro* differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. *Cell Differ.* **20**:171–182.

Keenen B, de la Serna I.L (2008). Chromatin remodeling in Embryonic stem cells: Regulating the balance between pluripotency and differentiation. *J. Cell. Physiol.* **219**:1–7.

Keles GE, Berger MS, Lim R, Zaheer A (1992). Expression of glial fibrillary acidic protein in human medulloblastoma cells treated with recombinant glia maturation factor-beta. *Oncol. Res.* **4**:431–437.

Kenworthy P, Dowrick P, Baillie-Johnson H, McCann B, Tsubouchi H, Arakaki N, Daikuhara Y, Warn RM (1992). The presence of scatter factor in patients with metastatic spread to the pleura. *Br. J. Cancer* **66**:243–247.

Kibbey MC, Royce LS, Dym M, Baum BJ, Kleinman HK (1992). Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumour cell line A253 on basement membrane components. *Exp. Cell Res.* **198**:343–351.

Kimhi YH, Palfrey C, Spector I (1976). Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethyl sulphoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:462–466.

Kinoshita T, Miyajima A (2002). Cytokine regulation of liver development. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**:303–312.

Kinsella JL, Grant DS, Weeks BS, Kleinman HK (1992). Protein kinase C regulates endothelial cell tube formation on basement membrane matrix, Matrigel. *Exp. Cell Res.* **199**:56–62.

Klagsbrun M, Baird A (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* **67**:229–231.

Kleinsmith LJ, Pierce GB (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **24**:1544–1551.

Kohlhepp EA, Condon ME, Hamburger AW (1987). Recombinant human interferon-α enhancement of retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells. *Exp. Hematol.* **15**:414–418.

Kondo T, Raff M (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**:1754–1757.

Kondo T, Raff M (2004). Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev.* **18**:2963–2972.

Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T (2014). Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS ONE* **9**(8):e104010.

Kujoth GC, Fahl WE (1997). c-sis/platelet-derived growth factor-B promoter requirements for induction during the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-mediated megakaryoblastic differentiation of K562 human erythroleukemia cells. *Cell Growth Differ.* **8**:963–977.

Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* **20**:320–331.

le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**:4637–4650.

Lechardeur D, Schwartz B, Paulin D, Scherman D (1995). Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp. Cell Res.* **220**:161–170.

Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* **50**:6334–6343.

Levi-Montalcini R (1966). The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* **60**:217–259.

Li AP, Roque MM, Beck DJ, Kaminski DL (1992). Isolation and culturing of hepatocytes from human livers. *J. Tissue Cult. Methods* **14**:139–146.

López-Ruiz E, Perán M, Picón-Ruiz M, García MA, Carrillo E, Jiménez-Navarro M, Hernández MC, Prat I, De Teresa E, Marchal JA (2014). Cardiomyogenic differentiation potential of human endothelial progenitor cells isolated from patients with myocardial infarction. *Cytotherapy* **16**(9):1229–1237.

Lotan R, Lotan D (1980). Stimulation of melanogenesis in a human melanoma cell line by retinoids. *Cancer Res.* **40**:33–45.

Luikart SD, Maniglia CA, Furcht LT, McCarthy JB, Oegama TR (1990). A heparan sulphate-containing fraction of bone marrow stroma induces maturation of HL-60 cell *in vitro*. *Cancer Res.* **50**:3781–3785.

Maas-Szabowski N, Fusenig NE (1996). Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **107**:849–855.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2002). Cell interaction and epithelial differentiation. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 31–63.

Majkut S, Dingal PC, Discher DE (2014). Stress sensitivity and mechanotransduction during heart development. *Curr. Biol.* **24**(10):R495–R501.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003). Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* **9**:1195–1201.

Marks PA, Breslow R (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* **25**:84–90.

Marks PA, Richon VM, Kiyokawa H, Rifkind RA (1994). Inducing differentiation of transformed cells with hybrid polar compounds: A cell cycle-dependent process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10251–10254.

Marte BM, Meyer T, Stabel S, Standke GJR, Jaken S, Fabbro D, Hynes NE (1994). Protein kinase C and mammary cell differentiation: Involvement of protein kinase C alpha in the induction of beta-casein expression. *Cell Growth Differ.* **5**:239–247.

Masui T, Lechner JF, Yoakum GH, Willey JC, Harris CC (1986a). Growth and differentiation of normal and transformed human bronchial epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **4**(suppl.):73–81.

Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC (1986b). Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2438–2442.

Matsui A, Zsebo K, Hogan BLM (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**:841–847.

McCormick C, Freshney RI (2000). Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **82**:881–890.

McCormick C, Freshney RI, Speirs V (1995). Activity of interferon alpha, interleukin 6 and insulin in the regulation of differentiation in A549 alveolar carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **71**:232–239.

McCormack SA, Viar MJ, Tague L, Johnston LR (1996). Altered distribution of the nuclear receptor rar (β) accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:53–61.

McLean JS, Frame MC, Freshney RI, Vaughan PFT, Mackie AE (1986). Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res.* **6**:1101–1106.

Meyskens FL, Fuller BB (1980). Characterization of the effects of different retinoids on the growth and differentiation of a human melanoma cell line and selected subclones. *Cancer Res.* **40**:2194–2196.

Mills KJ, Volberg TM, Nervi C, Grippo JF, Dawson MI, Jetten AM (1996). Regulation of retinoid-induced differentiation in embryonal carcinoma PCC4, aza1R cells: Effects of retinoid-receptor selective ligands. *Cell Growth Differ.* **7**:327–337.

Mitaka T, Norioka K-I, Mochizuki Y (1993). Redifferentiation of proliferated rat hepatocytes cultures in L15 medium supplemented with EGF and DMSO. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**:714–722.

Mitalipov S, Wolf D (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **114**:185–199.

Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* **31**:11–24.

Montesano R, Matsumonto K, Nakamura T, Orci L (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**:901–908.

Muffler S, Stark H-J, Amoros M, Falkowska-Hansen B, Boehnke K, Bühring H.J, Marmé A, Bickenbach JR, Boukamp P (2008). A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures. *Stem Cells* **10**:2506–2515.

Muller U, Wang D, Denda S, Meneses JJ, Pedersen RA, Reichardt LF (1997). Integrin alpha 8 beta 1 is critically important for epithelial–mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* **88**:603–613.

Murao S, Gemmell MA, Callaghan MF (1983). Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res.* **43**:4989–4996.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**:101–106.

Oft M, Akhurst RJ, Balmain A (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat. Cell Biol.* **4**:487–494.

Orellana SA, Neff CD, Sweeney WE, Avner ED (1996). Novel Madin Darby canine kidney cell clones exhibit unique phenotypes in response to morphogens. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:329–339.

Osborne HB, Bakke AC, Yu J (1982). Effect of dexamethasone on HMBA-induced Friend cell erythrodifferentiation. *Cancer Res.* **42**:513–518.

Paquette JS, Tremblay P, Bernier PV, Auger FA, Laviolette M, Germain L, Boutet M, Boulet L.P, Goulet F (2003). Production of tissue-engineered three-dimensional human bronchial models. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **39**:213–220.

Parkinson EK, Yeudall WA (2002). The epidermis. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2 ed. New York: Wiley-Liss, pp. 65–94.

Pevny L, Rao MS (2003). The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* **26**:351–359.

Pfeffer LM, Eisenkraft BL (1991). The antiproliferative and antitumour effects of human alpha interferon on cultured renal carcinomas correlate with the expression of a kidney-associated differentiation antigen. *Interferons Cytokines* **17**:30–31.

Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **444**:761–765.

Pignata S, Maggini L, Zarrilli R, Rea A, Acquaviva AM (1994). The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumour cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway. *Cell Growth Differ.* **5**:967–973.

Pignatelli M, Bodmer WF (1988). Genetics and biochemistry of collagen binding-triggered glandular differentiation in a human colon carcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5561–5565.

Planz B, Wang Q, Kirley SD, Lin CW, McDougal WS (1998). Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: Regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *J. Urol.* **160**:1850–1855.

Portnoy J, Curran-Everett D, Mason RJ (2004). Keratinocyte growth factor stimulates alveolar type II cell proliferation through the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-OH kinase pathways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**:901–907.

Post M, Floros J, Smith BT (1984). Inhibition of lung maturation by monoclonal antibodies against fibroblast-pneumocyte factor. *Nature* **308**:284–286.

Prasad KN, Edwards-Prasad J, Ramanujam S, Sakamoto A (1980). Vitamin E increases the growth inhibitory and differentiating effects of tumour therapeutic agents on neuroblastoma and glioma cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **164**:158–163.

Radisky DC, Hirai Y, Bissell MJ (2003). Delivering the message: Epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol.* **13**:426–434.

Raff MC (1990). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* **243**:1450–1455.

Raff MC, Abney E, Brockes JP, Hornby-Smith A (1978). Schwann cell growth factors. *Cell* **15**:813–822.

Rattner A, Sabido O, Massoubre C, Rascle F, Frey J (1997). Characterization of human osteoblastic cells: Influence of the culture conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:757–762.

Raz A (1982). B16 melanoma cell variants: Irreversible inhibition of growth and induction of morphologic differentiation by anthracycline antibiotics. *J. Natl. Cancer Inst.* **68**:629–638.

Rooney SA, Young SL, Mendelson CR (1995). Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* **8**:957–967.

Rossi GB, Friend C (1967). Erythrocytic maturation of (Friend) virus-induced leukemic cells in spleen clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**:1373–1380.

Rudland PS (1992). Use of peanut lectin and rat mammary stem cell lines to identify a cellular differentiation pathway for the alveolar cell in the rat mammary gland. *J. Cell Physiol.* **153**:157–168.

Sachs L (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature* **274**:535–539.

Safford KM, Rice HE (2007). Tissue culture of adipose-derived stem cells. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 303–315.

Sattler GA, Michalopoulos G, Sattler GL, Pitot HC (1978). Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res.* **38**:1539–1549.

Saunders NA, Bernacki SH, Vollberg TM, Jetten AM (1993). Regulation of transglutaminase type-I expression in squamous differentiating rabbit tracheal epithelial cells and human epidermal keratinocytes—effects of retinoic acid and phorbol esters. *Mol. Endocrinol.* **7**:387–398.

Schmidt R, Reichert U, Michel S, Shrott B, Boullier M (1985). Plasma membrane transglutaminase and cornified envelope competence in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* **186**:204.

Schwartz RS, Greenberg PL (1981). Stromal colony-stimulating activity production and myeloid colony-forming cells in human hemopoietic and nonhemopoietic bone marrow. *Blood* **57**:771–780.

Seifert W, Müller HW (1984). Neuron-glia interaction in mammalian brain: Preparation and quantitative bioassay of a neurotropic factor (NTF) from primary astrocytes. In Barnes DW, Sirbasku DA, Sato GH (eds.), *Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells*. New York: Alan R. Liss, pp. 67–78.

Shea CM, Edgar CM, Teinhorn TA, Louis C, Gerstenfeld LC (2003).

BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Cell. Biochem.* **90**:1112–1127.

Simon-Assmann P, Kédinger M, Haffen K (1986). Immunocytochemical localization of extracellular matrix proteins in relation to rat intestinal morphogenesis. *Differentiation* **32**:59–66.

Smith A (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* **441**:1060.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rodgers D (1988). Inhibition of pluripotential stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**:688–690.

Soriano V, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R (1995). Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108**:413–430.

Speirs V, Ray KP, Freshney RI (1991). Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts. *Br. J. Cancer* **64**:693–699.

Spinelli W, Sonnenfeld KH, Ishii N (1982). Effects of phorbol ester tumor promoters and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **42**:5067–5073.

Spooncer E, Eliason J, Dexter TM (1992). Long-term mouse bone marrow cultures. In Testa NG, Molineux G (eds.), *Haemopoiesis: A practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 55–74.

Spremulli EN, Dexter DL (1984). Polar solvents: A novel class of antineoplastic agents. *J. Clin. Oncol.* **2**:227–241.

Takahashi K, Suzuki K, Kawahara S, Ono T (1991). Effects of lactogenic hormones on morphological development and growth of human breast epithelial cells cultivated in collagen gels. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**:553.

Takahashi K, Tanabe M, Ohnuki M, Narita T, Ichisaka K, Tomoda S, Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861–872.

Takeda K, Minowada J, Bloch A (1982). Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1, a line of human myeloblastic leukaemia cells, after treatment with TPA, DMSO, or Ara-C. *Cancer Res.* **42**:5152–5158.

Tarella C, Ferrero D, Gallo E, Luyca Pagliardi G, Ruscetti FW (1982). Induction of differentiation of HL-60 cells by dimethylsulphoxide: Evidence for a stochastic model not linked to the cell division cycle. *Cancer Res.* **42**:445–449.

Terasaki T, Kameya T, Nakajima T, Tsumuraya M, Shimosato Y, Kato K, Ichinose H, Nagatsu T, Hasegawa T (1984). Interconversion of biological characteristics of small cell lung cancer cells depending on the culture conditions. *Gann* **75**:1689–1699.

Thomson AA, Foster BA, Cunha GR (1997). Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* **124**:2431–2439.

Torday JS, Kourembanas S (1990). Fetal rat lung fibroblasts produce a TGF-β homologue that blocks type II cell maturation. *Dev. Biol.* **13**:35–41.

Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisse C, Racevskis J, Augenlicht L (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the *in vitro*-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* **6**:749–757.

Venkatasubramanian J, Sahi J, Rao MC (2000). Ion transport during growth and differentiation. *Ann. NY Acad. Sci.* **915**:357–372.

Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R (2002). Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs* **171**:64–76.

Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M (2010). Direct conversion of fibroasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**:1031–1032.

Vilamitjana-Amedeebl J, Bareile R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF (1993). Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**:699–707.

Vunjak-NovakovicG, Freshney RI (eds.) (2006). *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Wada T, Dacy KM, Guan X-P, Ip MM (1994). Phorbol 12-myristate 13 acetate stimulates proliferation and ductal morphogenesis and inhibits functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *J. Cell Physiol.* **158**:97–109.

Wada Y, Kataoka H, Yokose S, Ishizuya T, Miyazono K, Gao YH, Shibasaki Y, Yamaguchi A (1998). Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. *Bone* **22**:479–485.

Wang CT, Meng M, Zhang JC, Jin CJ, Jiang JJ, Ren HS, Jiang JM, Qin CY, Yu DQ (2008). Growth inhibition and gene induction in human hepatocellular carcinoma cell exposed to sodium 4-phenylbutanoate. *Chinese Med. J.* (Engl.) **121**:1707–711.

Watanabe T, Kondo K, Oishi M (1991). Induction of *in vitro* differentiation of mouse erythroleukemia cells by genistein, an inhibitor of tyrosine kinases. *Cancer Res.* **51**:764–768.

Weiss L (1976). The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.* (Hoboken) **186**:161–184.

Willey JC, Moser CE Jr, Lechner JF, Harris CC (1984). Differential effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on cultured normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* **44**:5124–5126.

Wong YC, Wang XH, Ling MT (2003). Prostate development and carcinogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **227**:65–130.

Wuarin L, Verity MA, Sidell N (1991). Effects of interferon-gamma and its interaction with retinoic acid on human neuroblastoma differentiation. *Int. J. Cancer* **48**:136–141.

Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'amour KA, Lie CC, Gage FH (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* **430**:350–356.

Yamada KM, Geiger B (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:76–85.

Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM (1991). Control of cell pattern in the developing nervous.*system: Polarizing activity of the floor plate and notochord. Cell* **64**:635–647.

Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulost S, Wang F, McKeehan WL (1992). Heparin binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal to epithelial cell andromedin. *Mol. Endocrinol.* **6**:2123–2128

Yan Y, Zhao J, Cao C, Jia Z, Zhou N, Han S, Wang Y, Xu Y, Zhao J, Yan Y, Cui H (2014). Tetramethylpyrazine promotes SH-SY5Y cell differentiation into neurons through epigenetic regulation of Topoisomerase IIβ. *Neuroscience* **278C**:179–193.

Yen A, Coles M, Varvayanis S (1993). 1,25-dihydroxy vitamin D_3 and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate synergistically induce monocytic cell differentiation: FOS and RB expression. *J. Cell Physiol.* **156**:198–203.

Yevdokimova N, Freshney RI (1997). Activation of paracrine growth factors by heparan sulphate induced by glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **76**:261–289.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**:281–292.

Yu J, Vodyanik MA, Kim Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Shulan Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, James A, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**:1917–1920.

Zhao R, Daley GQ (2008). From fibroblasts to iPS cells: Induced pluripotency by defined factors. *J. Cell. Biochem.* **105**:949–955.

（陈 曦 石 程 译）

第 20 章

三维培养

20.1 细胞的相互作用和表型表达

维持组织块的体外生长和从组织块长出的细胞扩增的历史演变导致了器官培养和细胞培养的发展（参见 1.5 节），但细胞培养用得更广。目前，尽管增殖性的细胞系的潜在性应用远未开发出来，但许多人仍坚持这种观点，即添加营养物质和激素本身对于全面重建特定的培养细胞群体的结构和功能是不合适的（Ravi et al.，2015）。二维（2D）培养的重要缺失因素是细胞相互作用和信号转导，而它们直接地或通过构建为特异合适的基质是形成特异微环境所不可或缺的（参见 25.2.1 节）。另外，三维（3D）培养的密集细胞群中的细胞联系不仅增加细胞间相互作用而且建立扩散梯度的几何结构。细胞集落产生的细胞因子在中央处达到最高浓度，而通过扩散于边缘处消失，反之，外源性细胞因子在边缘处浓度最高而中央处浓度最低。扩散梯度被长期认为是形态发生必不可少的，这种梯度能够通过改变培养物的几何结构简单地建立起来（Warmflash et al.，2014）。

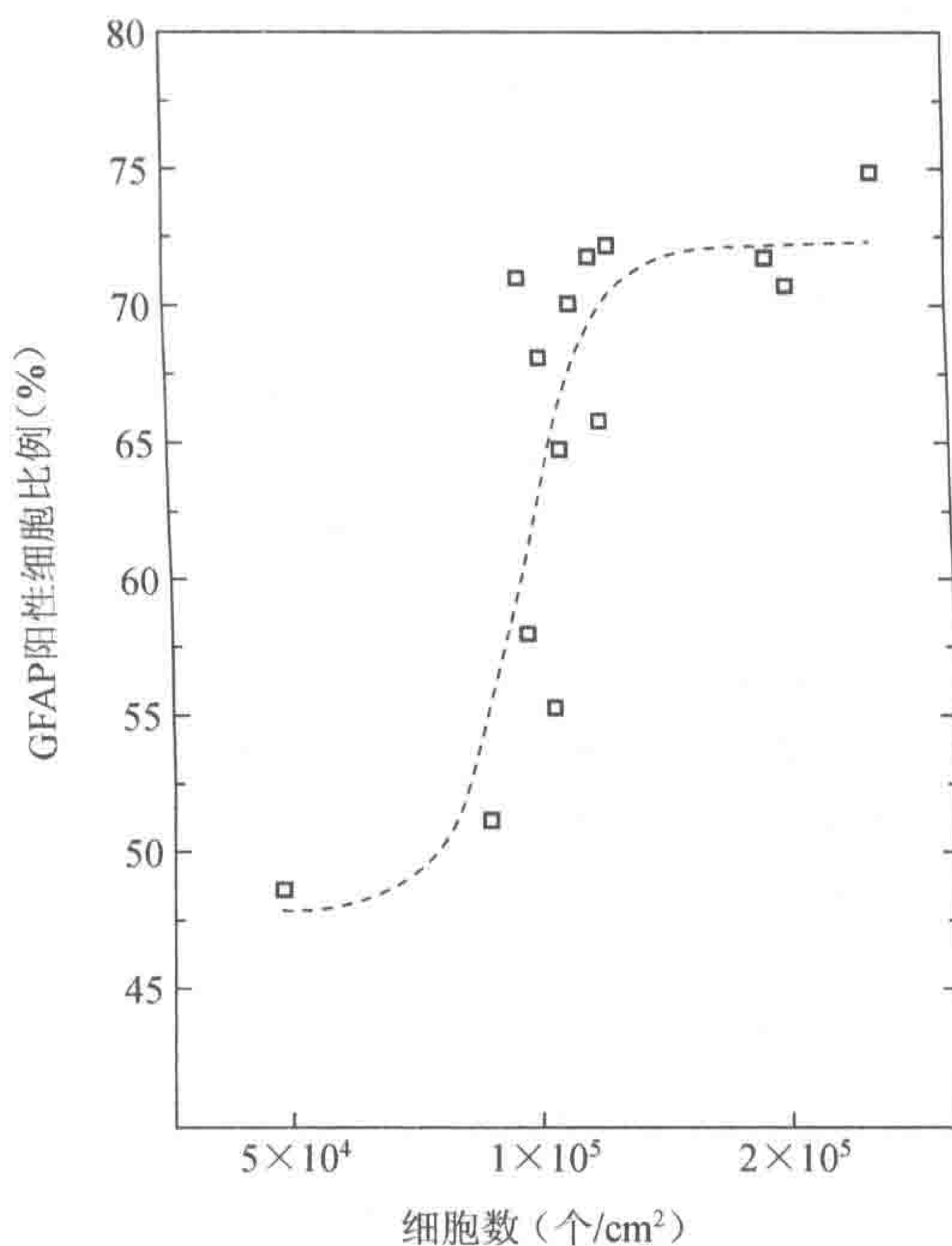


图 20.1 细胞密度对于 C6 细胞的 GFAP 表达的作用。将细胞按不同密度在培养瓶培养。固定细胞后，用免疫过氧化物酶对 GFAP 染色（见彩版 11b）。在选择视野重复计数细胞两次，计算阳性细胞的百分比（引自 R. L. Shaw）


彩版 11

培养的细胞达到汇合时，细胞之间的相互作用呈现在最简单的水平上。由于接触介导的信号转导、连接复合体的形成和同分泌因子（homocrine factor）的交换潜力升高（参见 2.5 节、19.7.1 节），细胞彼此之间加强相互作用。第一个显著作用是，使正常细胞的运动停止，即接触性生长抑制，并使细胞退出分裂周期，即细胞增殖的密度限制（参见 22.4.2 节）；转化细胞的增殖下降，凋亡升高。细胞具有分化能力时，已分化细胞的比例常增大。C6 鼠神经胶质细胞瘤细胞中的 GFAP 阳性细胞的百分比增大（图 20.1），分泌型或吸收型上皮细胞形成圆顶形结构（图 18.1；


彩版12

彩版 12a、b），骨骼肌细胞融合形成多核的肌管（彩版 3c）。正常成纤维细胞达到汇合后，尽管发生接触抑制，但分泌较多的胶原蛋白，并趋向于形成复层。上层细胞较小，染色深，类似结缔组织细胞（图 7.1b）。


彩版3

相互作用的不同细胞群对于它们的表型有相互作用（参见 19.7.1 节，图 19.2），发生的表型变化导致新的相互作用。发育肺的细胞相互作用涉及从间质细胞向上皮的 HGF、BMP4 和 FGF 信号转导和从上皮向间质的 PDGF 信号转导（Demayo et al.，2002）。同样在皮肤，表皮细胞的增殖和分化依赖于来自真皮的 KGF 和 GM-CSF 信号转导，该信号由从表皮向真皮的 IL-1 信号转导所激发（Maas-Szabowski et al.，2000，2002）。推测细胞相互作用不是单一的事件，而是连续的级联反应，这种反应依不同表型细胞对于信号转导过程的反应而变化。同样，由于外源性信号变更了一种或两种相互作用细胞的表型，但外源性信号不能只是激发起单一的事件。因此，尽管同源细胞群体可能激发单一反应，而更可以激发新的级联反应。

肺的肺泡细胞仅对邻近成纤维细胞释放的激素刺激发生反应，合成和释放表面活性物质（Post et al.，1984）。同样，发育中的前列腺上皮对基质信号反应，反过来，此反应被结合到基质和诱导 KGF 释放的雌激素活化（Thomson et al.，1997）。Linser 和 Moscona（1980）除去色素细胞和神经元，从视网膜的神经层分离出 Müller 细胞（星形胶质细胞）。他们观察到，除非将 Müller 细胞与视网膜的神经元共培养，糖皮质激素才能诱导 Müller 细胞的分化。糖皮质激素对脑其他部位的神经元无效。

上皮对基质成分反应而发生分化，这些基质成分常由一侧的上皮和另一侧的结缔组织共同分泌。在体外，表皮与真皮之间相互作用可能属于这种情况（Fusenig，1994a；Limat et al.，1995）。因此，完整的结合组织可对简单而普遍存在的信号发生不同反应，这并不是由信号的特异性或者受体的亲和力所决定的，而是由并列的一种细胞与另一种特别相关的细胞共同编码的微环境性质所决定的。正如在人类社会，个体对外部刺激的反应不但受到个体内部结构的制约，也同等程度地受到这个个体与其他个体在空间和时间上的相互关系的制约。同样，原始神经嵴细胞可以分化为神经元、内分泌细胞或黑素细胞，这取决于其最终定位、与相邻细胞的相互作用和由邻近细胞介导的对激素刺激的反应等。

已证实三维培养可使适宜的干细胞微环境保留下来，肝和胰源性干细胞依赖于使用的培养基可被克隆、扩增或诱导分化（Labarge et al.，2007；Huch et al.，2013a，2013b）。小鼠和人胚胎干细胞的维持需要细胞保持为高密度簇状或球形结构，从而维持干细胞表型。因此，不限于是分化后细胞需要通过三维培养提供微环境。

实质上，尽管细胞在分离时发挥细胞增殖、糖酵解、呼吸和基因转录等功能，但有关功能性多细胞有机体的这些功能的调节，最终取决于合适谱系及其合适阶段的细胞间相互作用，以及在同样微环境中的不同谱系细胞间的相互作用。此外，该微环境的建立取决于高密度生长的不同谱系细胞的空间相互作用。这一概念提示，如要研究分离细胞的生物学或者将这些细胞用作底物、常规的单层培养或悬浮培养是合适的，但如果你要了解在体完全分化组织细胞的一些整体功能或功能障碍，需要组织型或器官型培养模型。

20.1.1 三维培养的优点和局限性

从前述清楚地看出，通过三维培养建立适宜的微环境对于依赖提供的化学信号使正常分化细胞的表型表达和维持干细胞存活具有重要意义。没有三维几何结构或许不可能引起一定的形态发生。然而，三维培养有着局限性。最明显的局限性是限制营养物质和氧气扩散入培养物，以及代

谢废物如乳酸和 CO_2 向外扩散。体内分布着密集的毛细血管网，能够避免这些限制。但是，在体培养物的最大半径限于约 500μm。因此，要增大三维培养物需使用精致的几何装置如微管床灌注，以使扩散距离达到最小。另一种方法用培养物自身的微管网提供扩散，该目标尚未实现，但生物打印技术有着良好前景（Kolesky et al.，2014）。

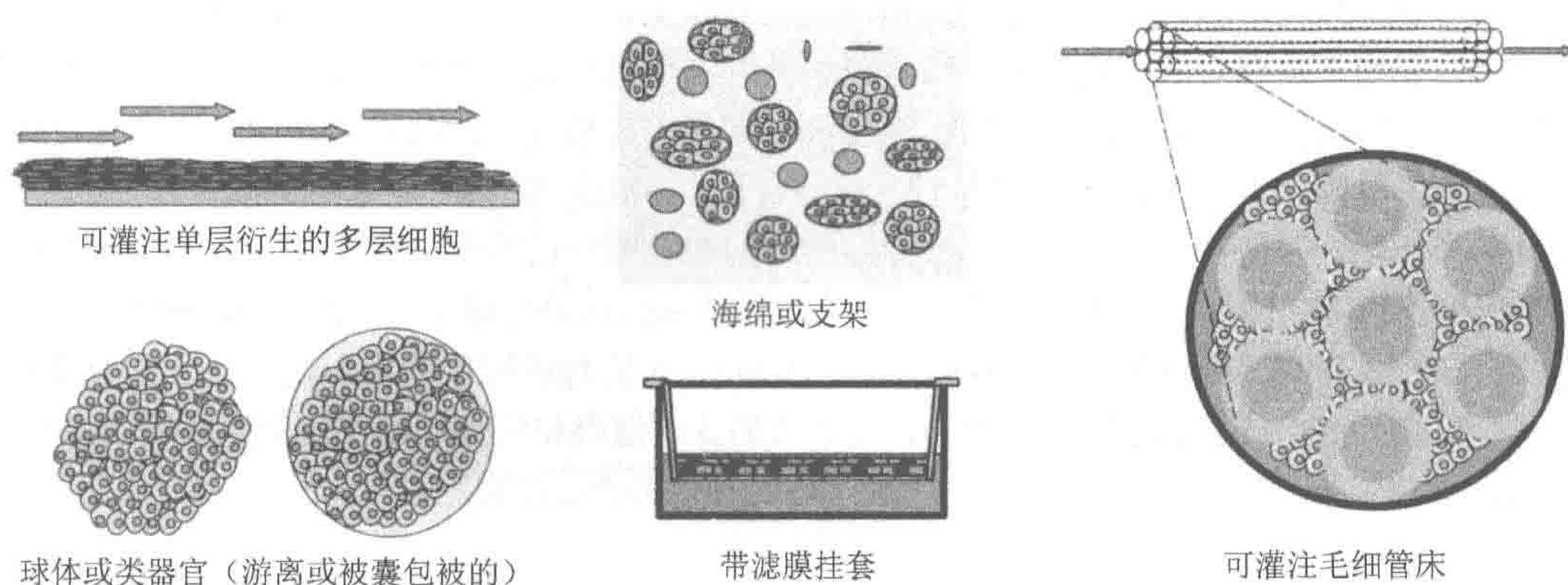
其他主要限制在于难以观察培养物的生长和活性，以及培养物对于不同实验条件的反应。在某些情况下，共聚焦激光显微镜有助于获得三维图像和记录细胞运动或信号变化引起的荧光变化如钙离子释放。然而，用于固定的和活的三维培养物观察的新技术也正在出现（参见 20.5 节）。

20.1.2 模型的选择

这里有两种主要途径达到三维培养，一是明确细胞在组织内的分布，将组织取出，按器官培养维持细胞生长；二是纯化和扩增每个细胞谱系，在同种细胞相互作用的条件下进行单独研究，然后再将这些细胞结合起来研究其共同的相互作用。这些方案产生了 3 种主要的三维培养技术：①器官培养，是将整个器官或者具有代表性的部分以小组织块的形式在培养中维持生长，并保留参与细胞在数量和空间上的内在分布；②组织型培养，是将扩增的细胞在三维的基质中单独培养至高密度，或者使其在悬浮状态下形成三维聚集物；③器官型培养，是将不同谱系的细胞按照实验确定的比率和空间关系结合起来，重新构筑研究状态下的器官成分（图 20.2）。

器官培养的目的是保持相同类型或不同类型细胞原有的结构关系及由此产生的相互作用，以便研究外源性刺激对进一步发育的作用（Lasnitzki，1992；Hume et al.，1996；Kuslak and Marker，2007；Dame et al.，2008）。正如 Grobstein 和 Auerbach 及其他人在器官形成的新型实验（Auerbach and Grobstein，1958；Cooper，1965；Wessells，1977）（另见 19.7.1 节）中所述，这种关系可通过取出完整无损的组织予以保存，或者通过将这些组织成分分离后再组合起来而建立。器官型培养另外一方面是指这种合成技术，通过将分离的（最好是纯化和特化的）各细胞谱系重新结合起来，建立一种三维的、高密度的器官型培养。然后，研究各细胞谱系的相互作用并得出对外源性刺激发生反应的特点。外源性刺激可能是调节性激素、营养条件或异生物。在每一种情况下，这种反应与分离的单一种细胞在低细胞密度生长条件下的反应可能是不同的。

（a）组织型培养



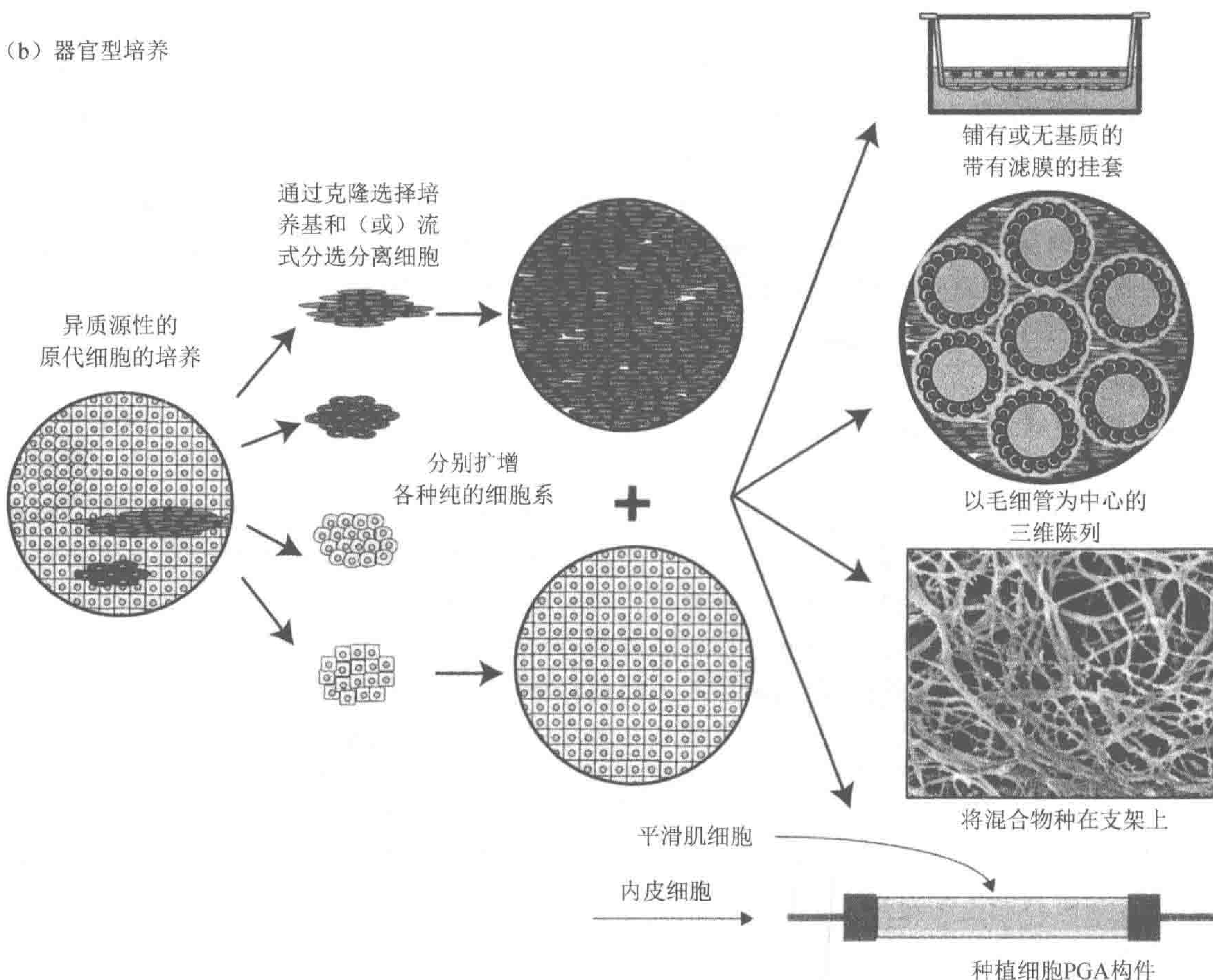


图 20.2 三维培养。不同的三维培养模型：（a）组织型培养，只有一种细胞；（b）器官型培养，有两种或两种以上从组织分离的细胞。右下角是 PGA 构件的放大图（引自 Klinger et al.，2006）

短篇综述 20.1 三维细胞培养技术运用进展及体外组织样构筑的形成*

细胞适应微环境的变化，这包括对生物信号、化学刺激或周围物理结构改变作出反应。每种反应具有通过细胞增殖、活性、分化、结构或功能的变化显著改变或调节细胞行为的潜力。细胞培养的主要物理差别与细胞在常规塑料器皿培养时的形状和几何有关。细胞适应非自然的二维底物和重构，形成扁平形态。随即细胞出现极性，常失去自然构筑。已研究表明这些变化可改变基因表达和蛋白质合成，从而影响功能（Thomas et al.，2002；Vergani et al.，2004）。因此，常规的二维培养不能较好地体现在体组织相应细胞的结构和功能，这对于细胞功能发挥和生物学检测结果有着显著影响。例如，二维培养可引起细胞增殖增强，而分化减弱（Cukierman et al.，2002）或对细胞毒性试剂的反应发生改变（Sun et al.，2006）。人们普遍接受的是，设计更适宜的细胞培养微环境有助于细胞较正常地发挥功能和有益于人们认识健康和疾病状态下的细胞生物学。

---

* 由 Stefan Przyborski 教授（Cell Technology School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Durham UK; stefan.przyborski@ durham.ac.uk）撰写。

多年来已认识到用三维方法培养细胞能够加强细胞结构和功能，以及改善体外检测的生理学关联性。措施如下：①用最少的外源性支持和干预使每群细胞建立正常的三维结构和功能；②降低细胞适应于扁平的二维培养面引起的应激和人为性反应；③促进细胞与相邻细胞形成复杂的相互作用并接受和传递信号；④提供三维物理环境使细胞能够在空间上构成更自然的组织样结构。

然而，近年来发展的技术使科学家能够常规地进行三维培养。与常规的二维培养相比，三维培养模型的建立具有技术挑战性，花费昂贵。在某些方面，有人认为这有碍于接受这种技术和苦恼于得到细胞行为有关的较精确、可预测性和有价值的实验结果。另外，近来三维培养被广泛常规应用。已发明各种方法以满足增长的三维培养需要，使三维培养容易进行。应该承认没有单一方法满足三维培养所有需要，故研究者需为细胞检测选择最适合三维培养的模型。

三维培养技术大致分为非支架培养系统和支架培养系统，支架用自然材料或合成材料制成。下面介绍一些近来应用非常流行的技术，包括三维聚集培养物、球体、凝胶和基于支架的培养技术（图 20.3）。

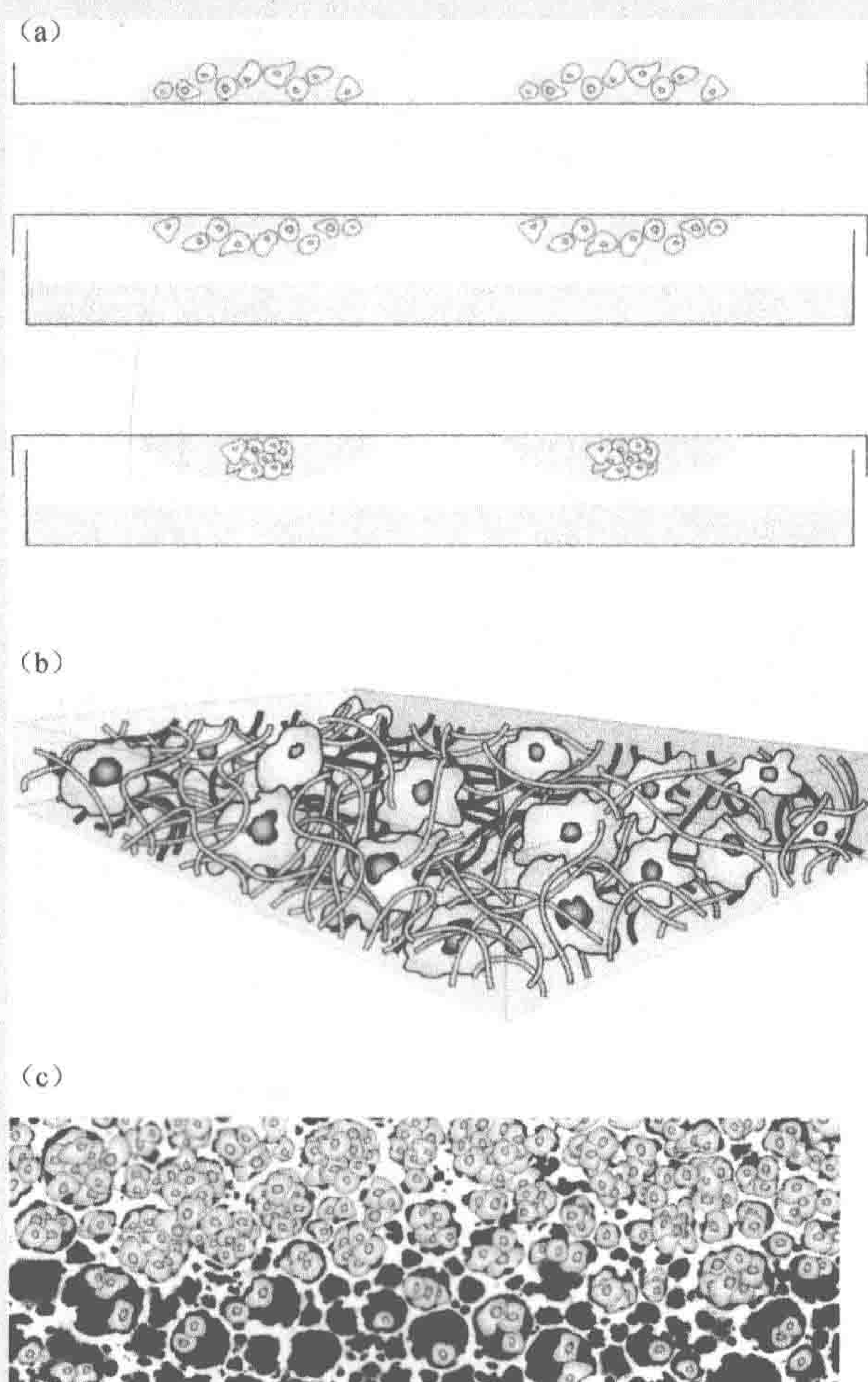


图 20.3 当前应用于三维培养的主要技术。(a) 类球体形成。将载有一滴细胞悬液的常规 Petri 皿盖翻转过来，培养液中悬浮的细胞增殖形成三维聚集物，继而形成三维微型组织；(b) 应用凝胶技术建立三维细胞结构。将细胞种植入蛋白质基质，建立纳米尺度的三维微环境，以模拟细胞外基质结构；(c) 有孔固体支架。这种支架建立三维微环境，细胞能够进入并生长形成三维结构。细胞在支架内并不变得扁平，而保持较自然的三维形态，与附近细胞发生密切联系，从而形成三维组织样结构（引自 Stefan Przyborski）

类球体常被看作悬着复合细胞球形聚集物的非支架模型。球体可由单种细胞组成或多种细胞共培养组成。细胞本身产生细胞外基质，由此形成不同比例的较硬结构，这取决于细胞类型和培养时间。将细胞培养成球体的方法包括传统的悬滴技术和近来的低附着培养板（表20.1）。翻转培养皿盖，使一滴培养液悬挂。悬浮的细胞在悬滴下端聚集形成三维球体（图20.3a）。该技术有许多用处，在干细胞研究方面常用于建立胚体（Keller，1995）。最近，为了提高应用效率，发明了自动化和有效形成悬滴的技术，特别是在癌研究方面（Vinci et al.，2012）。低附着培养板如纤维制备的底物降低细胞附着于培养器皿的底面，使细胞在悬浮状态下生长（Miyagawa et al.，2011）。过一段时间细胞聚在一起形成三维聚集物。这是产生大量三维培养物的有效方法，但在聚集物大小方面没有细致的对照。

表20.1 可选择的基于聚集的技术

商标	供应商	网址	特点
Gravity Plus	InSphero	www.insphero.com	特殊设计的培养板，优化细胞球体的形成
Perfecta 3D Hanging Drop plates	3D Biomatrix	www.3DBiomatrix.com	同上
The 3D Petri Dish	Microtissues	www.microtissues.com	用微模具制备琼脂糖培养皿，以产生细胞聚集物
Micro-space Cell Culture Plates	Elplasia（Kuraray Co. Ltd.	www.Kuraray.co.jp	工程化培养板表面，并带方格，促进球体培养
Nanoculture Plates	Scivax	www.scivax.com	基于纳米技术的低附着培养板，抑制细胞附着，使细胞生长成聚集物
Lipidure Coat	NOF America Corporation	http://nofamerica.com	低细胞附着培养板和培养皿，高效产生球体
Biolevitator	Hamilton	www.hamiltoncompany.com	用磁颗粒使细胞聚集物悬在培养液中，需要特殊的器皿和设备

凝胶是三维培养的常见选择。细胞包裹于自然材料交联的疏松支架结构即凝胶（如琼脂糖、纤维蛋白和胶原蛋白）中，在培养液中孵育（Tibbitt and Anseth，2009）（图20.3b）。凝胶为三维培养提供了通用技术，可为支持特殊类型细胞生长进行设计，将细胞局限于人工细胞外基质环境中（Jongpaiboonkit et al.，2008）或使细胞从平面迁移入凝胶内（Topman et al.，2013）。可变更细胞外基质的成分以结合生物活性分子，从而直接影响细胞在三维环境中的行为。基本上有自然凝胶和合成凝胶两类技术（表20.2）。根据材料自然性和使用方法，凝胶培养能使细胞聚集物生长、形成细胞管和分支及构筑成层结构。将不同细胞混合并建立共培养使容易获得不同类型细胞成为可能。

表20.2 可选择的基于水凝胶的技术

商标	供应商	网址	特点
Cultrex	Trevigen	www.trevigen.com	将球体形成细胞外基质与球体形成培养板相结合
Matrigel	Corning Life techologies	www.bd.com/biosciences	最流行和应用广泛的产品，由肉瘤细胞提纯
Extracel line；Hystem line	Glycosan	www.glycosan.com Now BioTime Inc.	用于三维培养的定制凝胶，成分限定、释放生长因子、生理性质、可注射
3D Life Biomimetic Hydrogels	Cellendes	www.cellendes.com	用于三维培养的定制凝胶，成分限定、生物仿生修饰可控、凝胶硬度可调
PureCol	Advanced Biomatrix	www. AdvancedBiomatrix. com	纯化的人或牛胶原蛋白凝胶、用于组织工程和细胞培养
QGEL 3D Matrix	QGEL	www.qgelbio.com	限定的水凝胶技术，无RGD基序

固体支架为细胞生长、增殖和分化提供了三维空间，使细胞构建组织样三维结构（图 20.3c）。惰性固体支架的优点之一是利用比常规培养更合适的程序，能够以可控、可复制模式支持 3D 培养和组织细胞的排列（Knight et al.，2011）。固体支架的开孔结构容纳细胞，而细胞进入 3D 物理环境。此环境可通过表面修饰、添加信号分子、改变机械性硬度和添加如传统细胞培养所用的常用细胞外基质等调节。能够购买到的支架可常规用于 3D 培养，克服操作者自己制备材料引起的不贴实际和差别问题。可用合成材料和自然材料制备支架。自然材料或生物可降解材料在组织工程应用方面很有用，而合成支架无活性，更适合于实验性检测，可更精确地控制实验变化。已发明制备这种有孔支架的许多加工方法，利用各种方法制备具有特性的支架，以便应用于以特殊方式控制细胞生长。例如，薄膜支架对于产生由几层不同细胞组成的解剖学上的组织样结构特别有用（图 20.4）。

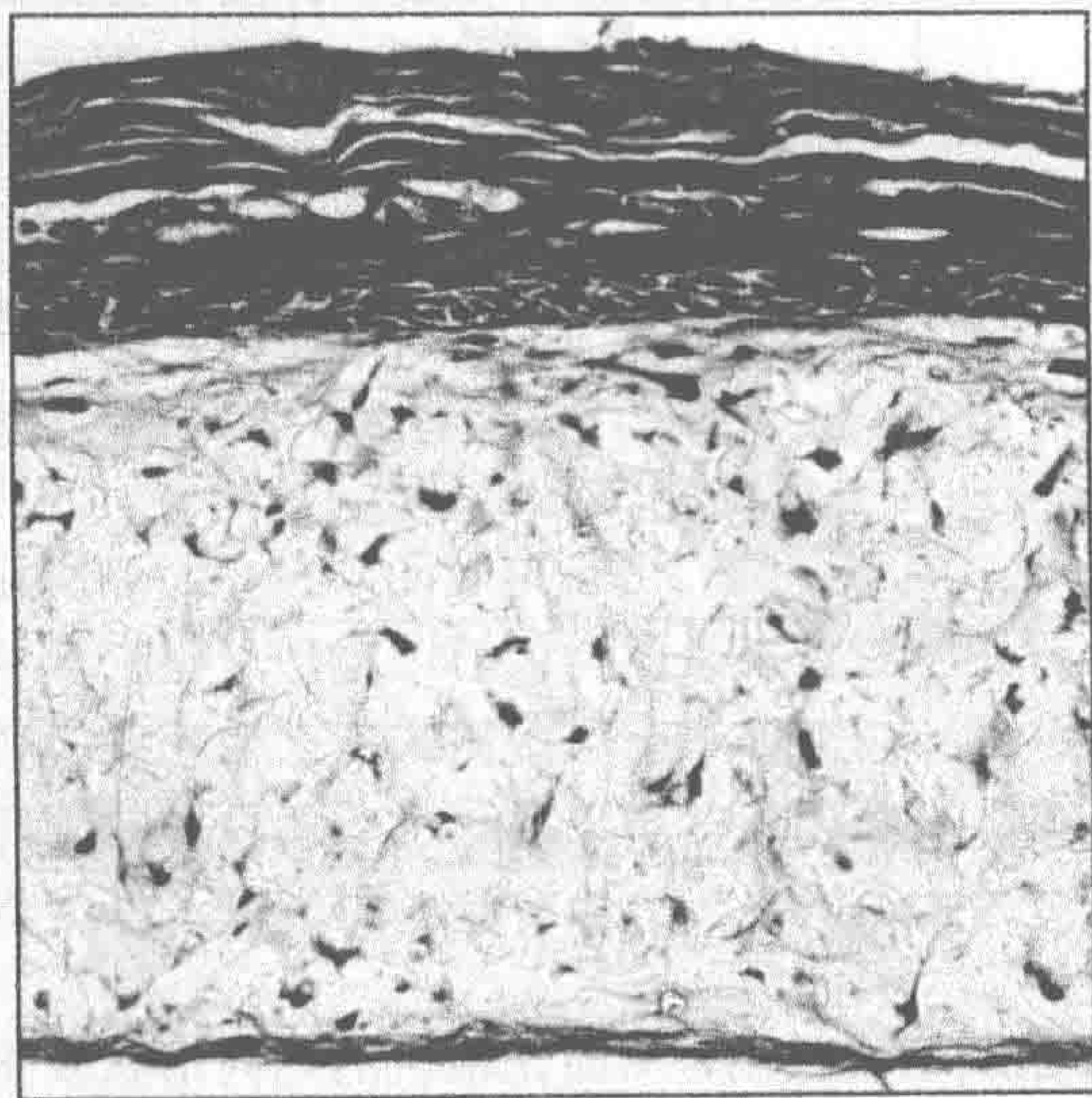


图 20.4 建立由数层不同细胞组成的组织样结构。此图列举了人的皮肤生长在膜状有孔支架上的体外模型。构建过程如下，首先将人的原代真皮成纤维细胞种植在 200μm 厚的有孔聚苯乙烯支架上，培养 7 天；然后将人的原代角化细胞种植于其表面，在液气界面条件下继续培养 14 天。随着时间皮肤构件逐渐成熟，此时上面的角化细胞形成复层上皮，下面有真皮细胞支撑。标尺为 50μm（Durham University 的 Robinson N 馈赠）

综上所述，近来的技术进展给科学家提供了 3D 细胞培养和体外构建组织样结构的新方法。这种技术与其他领域如干细胞科学的进展相结合将使研究者用人的细胞建立更复杂的体外模型。相应地，这将有利于进一步理解健康和疾病的细胞分子机制，改善科学发现的效率，从而可以减少动物的使用。

20.2 器官培养

20.2.1 气体和营养物质的交换

在器官培养中，组织构筑的一个主要缺陷是缺乏血管系统，仅靠扩散则限定了组织大小和器官培养物内潜在的细胞极性。将细胞作为一种固体的组织块培养时，气体的扩散及营养物质和代

谢产物的交换在外周部发生，故这种扩散对组织大小有限制。悬浮培养或单层培养的每个细胞是二维的，以致扩散不受限制。但是，细胞的聚集物在直径大于 250μm（5000 个细胞）时，存活开始受到扩散限制。当直径达到 1.0mm 或 1.0mm 以上（约 2.5×10^5 个细胞）时，中心区常出现明显的坏死。为了缓解这个问题，通常将器官培养物放在液气相界面，以便促进气体交换，而且保持与营养物质接触。通过将植块放入滤膜嵌套内（图 20.9、图 20.10）或放于暴露于空气中的筏或凝胶上，可建立大部分培养系统（图 20.5），但通过摇动培养物使其交替暴露于培养液和气相中（Nicosia et al.，1983；Lechner and LaVeck，1985）（参见方案 25.9-Su），或使用旋转瓶或旋转管（参见方案 21.3），可对附着于固体底物上的植块进行充气。

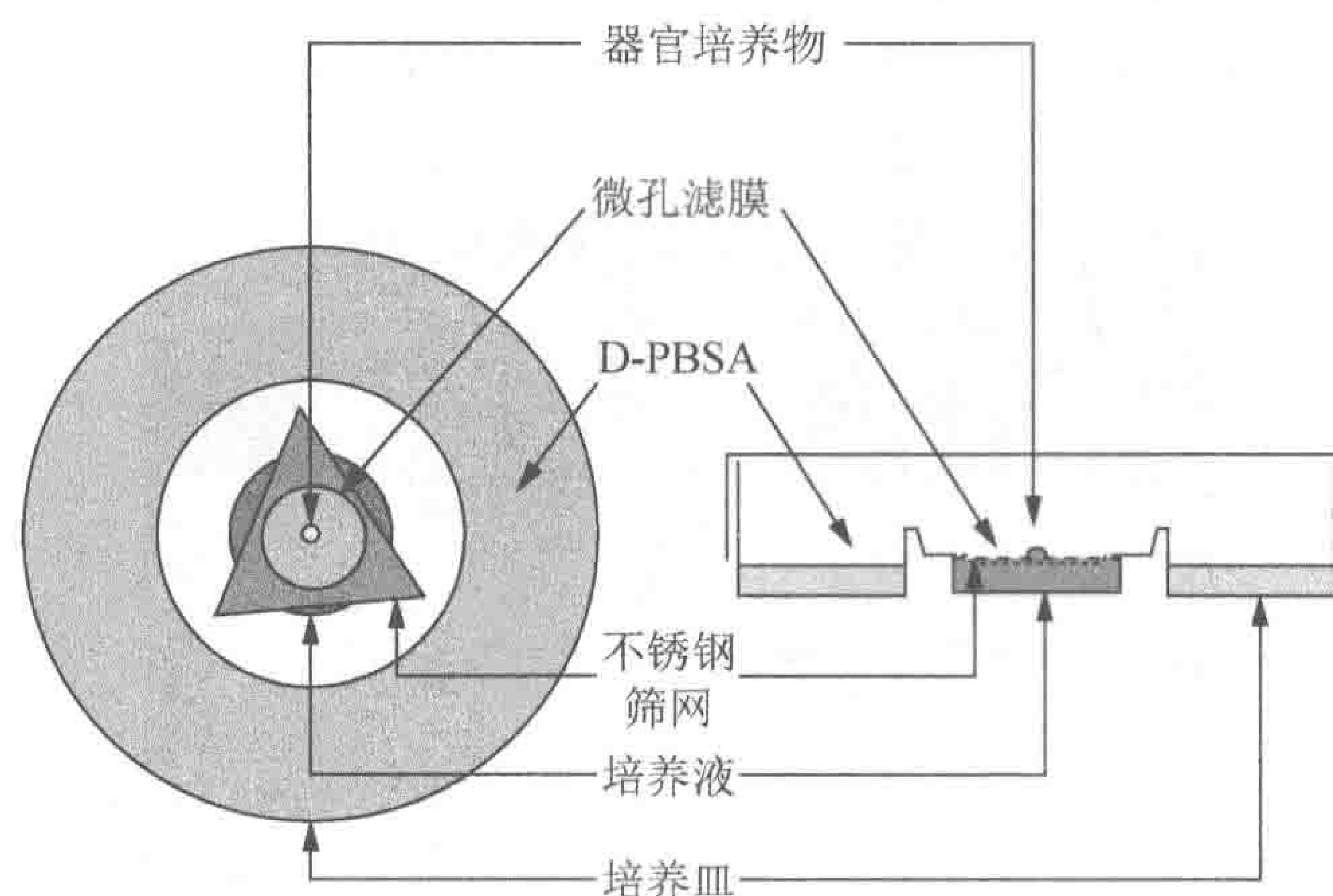


图 20.5 器官培养。将组织块放在不锈钢网上面的滤膜上，不锈钢网位于器官培养皿中央的小池上方。也可使用滤膜小皿插件（参见 20.3.9 节）

附着于固体底物可使细胞从植块长出，从而使植块的几何形状发生变化，使用不被浸湿的表面可以使这种效应减小到最低限度。在气液界面培养的优点之一是，如果将液体保持在正确水平，植块维持球形。若液体太深，气体交换降低；若太浅，表面张力能使植块变扁，并促进细胞长出。

将氧的浓度升高至纯氧或使用高压氧可增加氧的渗透性。提高 O_2 的张力对于某些组织，如甲状腺（de Ridder and Mareel，1978）、前列腺、气管（Dame et al.，2010）和皮肤（Lasnitzki，1992），尤其是从新生儿或成年人获得的组织可能是有益的。但也存在处于 O_2 引起的毒性危险之中。由于增加 O_2 张力不能促进 CO_2 释放或营养物质与代谢产物的交换，故可通过其他限定性因素取代增加的氧作用。

20.2.2 结构的完整性

此外，采用器官培养作为一种优于细胞培养的体外技术，主要是为了保持结构的完整性。虽然细胞培养是利用机械分离或酶消化分离的细胞，或者是自发迁移的细胞，但器官培养是以维持见于正常组织的细胞联系为目的的。最初，选择器官培养以促进组织学特征形成，但最后发现某些表型成分的表达仅见于将细胞维持密切结合状态。维持结构完整性的原因已叙述过（参见 20.1 节）。

20.2.3 生长与分化

在生长与分化之间有一种关系致使分化的细胞不再增殖（参见 19.3 节）。如果仅仅提供一

种可被接受的外源性分化诱导物，则不论细胞密度如何，细胞生长停止本身也可能参与分化的诱导。因为细胞增殖的密度限制和物理限制受到器官培养的几何形状的影响，大多数器官培养物不生长，或者即便生长，增殖也仅局限于外部的细胞层。因此，如果给予适当的细胞相互作用和可溶性诱导物（参见 19.7 节），培养物的状态允许分化，并可为分化发生提供一种理想的环境。

20.2.4 器官培养的局限性

器官培养的实验分析主要依靠组织学技术，不宜于进行生物化学和分子生物学分析。生物化学检验需要样本方面的可重复性，这种可重复性在器官培养远远不如扩增的细胞系那么容易达到，这主要是由制备器官培养物时取样的差异、在处理标本和几何形状方面的细小差别，以及培养物中各种细胞比率的差异所造成的（表 1.4）。

器官培养的建立比由已扩增的细胞系进行重复传代培养更加困难，没有可供参考的有关特征性产品。器官培养不能扩增，故每次实验都需要最初的供体组织，导致实验准备费力。另外，结果通常是有用组织的产量太低，以致没有进行生物化学和分子生物学分析的价值。此外，由于相互反应的细胞可能是培养物的一小部分，将分子反应归属于正确的细胞类型需要通过组织切片进行放射自显影、组织化学或免疫细胞化学的原位分析。

器官培养基本上是一种研究整体组织的行为而不是分离细胞的技术。确切地说，对于多细胞生物的基因表达调控和最终的细胞行为将来需要进一步研究。但是，受器官培养系统影响的限制，导致在纯化的细胞类型之间重新建立系统可以在这个特殊阶段提供更多的信息。然而毫无疑问，器官培养对于我们了解发育生物学和组织相互作用已经作出了许多贡献，并在适当的合成系统缺乏时将继续作贡献。

20.2.5 器官培养的类型

根据需要，器官培养技术需将组织放在理想的气体和营养物质交换的位置，故这些技术的大多数是将组织放在半固体琼脂凝胶底物上（Wolff and Haffen，1952）或凝集血浆（Fell and Robison，1929）的气液界面上，或者放在由不锈钢网支托的微孔滤膜、擦镜纸或人造纤维的筏上（Lasnitzki，1992，见图 1.3），或黏附到有机玻璃或树脂玻璃条上的气液界面（Auerbach and Grobstein，1958）。目前用滤膜嵌套最容易获得这种几何形状（参见方案 20.3）。方案 20.1 使用鸡胚原始器官，但适应于许多其他的组织类型。

方案 20.1 器官培养

概要

切除器官或组织，将其切成 $1mm^3$ 小块，或成薄膜状、杆状，然后，将组织放在位于气液界面的支持物上（如滤膜小皿插件，图 20.9 和图 20.10）。在湿润的 CO_2 培养箱中培养，根据需要更换培养液。

材料

无菌或无菌制备

- 含有或不含有血清的培养液（如 M199）
- 非组织培养处理的滤膜小皿插件（如 Corning Transwell 聚碳酸酯，#3402）
- 12 孔的培养板（Corning）
- 吸管
- 解剖器械

非无菌

- 已受精的鸡蛋，孵育 8 天

操作步骤

1. 将滤膜小皿插件放在多孔培养板的各个孔内。
2. 加入培养液直至达到滤膜底面水平（约 1mL，以滤膜和孔的大小而定）。
3. 将多孔培养板放入湿润的 37℃恒温 CO_2 培养箱中，以调整培养液的 pH 在 37℃为 7.4。
4. 准备组织或切出整个胚胎器官（如 8 天鸡胚的股骨或胫骨；见方案 11.2 和方案 11.7）。在一个方位，组织必须不超过 1mm 厚，最好更小（如 8 天胚的胫骨长度可能是 5mm，但直径仅 0.5~0.8mm。皮肤小块可为 $10mm^2$，但厚度仅为 200μm。必须切成小块的组织不应大于 $1mm^3$，如肝或肾）。
5. 在短时间内解剖标本（<1h），用 HBSS 即可。但是，较长时间解剖时应使用添加 50%血清的 HBSS 或完全培养基，并且加 HEPES 缓冲至 pH 7.4。
6. 从培养箱中取出多孔板，小心地将组织转移到滤膜上。这一步最好用 Pasteur 吸管完成，可同时吸出随组织块转移出的液体，应小心不要刺破滤膜。在吸取前，先用培养液湿润吸管内壁，以防止吸取时组织块粘到吸管壁上。
7. 检查培养液的水平，确认将组织浸湿但没有完全浸没，然后将培养板放回培养箱中。
8. 2~4h 后再次检查，确保培养液面保持在滤膜和组织块之上，但深度不足以淹没组织块或使其浮起。
9. 将组织培养 1~3 周，根据样本需要，每隔 2~3 天更换培养液 1 次。

其他说明

（1）培养液。可使用含有或不含有血清的 M199 或 CMRL1066，可用 BJG 培养液培养软骨或骨（Biggers et al.，1961）。

（2）支持物的种类。器官培养可用滤膜如多聚碳酸盐支持，这种滤膜放于中心孔器官培养板（Falcon #353037，见图 20.5）内的不锈钢网上面。然而，滤膜小皿插件在处理、大小、材料和基质包被方面有许多优点（图 20.11，表 20.3）。不同类型的组织可以结合到滤膜的相对面上，以研究这些组织的相互作用（参见 19.7.1 节）。此外，用小的滤膜小皿插件（如 6.5mm，Corning #3413,5），在滤膜上面的培养液形成新月形液面，此液面对于气体交换有较大的表面积。通过升高或降低培养池中培养液的高度，可以改变组织的构型。培养液过深可使植块变圆，过浅可使植块变扁。

（3）滤膜的孔径。孔径≤3μm 的滤膜通常不考虑用于穿越孔的细胞传代。

（4）O_2 张力。通常情况下，胚胎培养物最好保持在空气中，但晚期胚胎、新生儿和成人组织维持在高氧气中更好（Trowell，1959；de Ridder and Mareel，1978；Zeltinger and Holbrook，1997）。

（5）搅拌培养。小组织块在旋转振荡器中搅拌培养已用作侵袭分析的对抗性培养（Mareel et al.，1979；Bjerkvig et al.，1986a，1986b）（参见方案 20.4）。

（6）摇动或旋转培养。使组织附着于底物，然后将培养器皿放在摇动的平台上，使组织交替进入培养液相和气相（参见方案 22.9；Nicosia et al.，1983）；或者，也可使组织附着于旋转瓶或旋转管的壁上（参见 4.3.4 节和方案 21.3）。

表 20.3 滤膜小皿插件的类型

公司	名称	材料	性质	透明度	孔径/μm
Millipore	Millicel	硝化纤维	网	不透明	0.45
		聚烯烃	网	透明	0.45
Corning	Transwell	聚碳酸酯	无筛网	透明	5~8
				半透明*	0.45~1.0
Sigma-Aldrich	CellCrown	聚乙烯对苯二甲酸三酯	无筛网	透明	8
Greiner Bio-One	Thinsert	聚乙烯对苯二甲酸三酯	无筛网	透明	0.4~3
				半透明	0.4~8

* 孔越多，透明度越低。孔径小的滤膜有较多的孔，结果透明度较低

20.3 组织型培养

在本节中，将组织型培养定义为高密度细胞培养，细胞密度接近于体内组织。人们已在用分散的单层培养细胞建立组织样结构方面进行了各种尝试。Green 和 Thomas（1978）提出，如果保持几周而不转移，人的表皮角质形成细胞可形成皮纹(即摩擦嵴)。Folkman 和 Haudenschild(1980)和其他研究者（Pelletier et al.，2000）证实，在存在内皮生长因子和肿瘤细胞条件培养基的情况下，培养的血管内皮细胞能够形成毛细血管样的结构，常见于 Matrigel 存在时（Donovan et al.，2001；Ponce，2009）。


彩版 19

细胞达到高密度时，培养液中的营养物质会缺乏。为了避免营养物质缺乏，培养液量与细胞数目之比应大约维持在低密度培养水平。将细胞种植于小盖玻片（置于较大的非组织培养级培养皿的中央）上，或使用滤膜小皿插件，即可维持营养。滤膜小皿插件有利于高密度的有极性培养物的建立和不同种类细胞结合形成器官型培养物（参见方案 20.3，20.4 节，彩版 19~21）。较高的培养液与细胞比率也可通过扩散维持（参见 20.3.2 节）。


彩版 20


彩版 21

20.3.1 凝胶和海绵技术

Leighton 首次报道，正常细胞和癌细胞均能够穿过经胶原蛋白涂布的纤维素海绵(Leighton et al.，1968)。Gelfoam 凝胶泡膜（用于整形外科的一种明胶海绵基质）可用于取代纤维素（Sorour et al.，1975），并已用于研究机械性牵拉对肺发育的作用（Liu et al.，1995）。这些系统需要进行组织学分析，而且像器官培养一样，在体积方面受气体和营养物质扩散的限制。伴随组织工程的

发展，三维海绵和凝胶的应用明显增多（参见20.4.2节）。

胶原蛋白凝胶 胶原蛋白凝胶（天然胶原蛋白，与非天然胶原蛋白包被物不同）为原始上皮结构的形态形成提供了一种基质。许多不同类型的细胞能够渗入这种基质，建立组织样结构。哺乳类上皮在胶原蛋白中生长时形成发育不全的管状和腺状结构（Gomm et al.，1997），但乳腺癌细胞呈非组织性生长（Berdichevsky et al.，1992）。肾上皮细胞系MDCK对成纤维细胞的旁分泌刺激起反应，形成管状结构，但仅在胶原蛋白凝胶中形成（Kenworthy et al.，1992）。胶原蛋白凝胶也是许多皮肤器官样模型（参见20.4.1节，彩版20）、分化的肝细胞（Gomez-Lechon et al.，1998）和新生血管（Ment et al.，1997；Yang et al.，2004）的重要成分。在胶原蛋白凝胶上生长的交感神经节细胞，轴突沿凝胶中胶原蛋白纤维方向长出（Ebendal，1976）。


彩版20

Matrigel Matrigel是一种商业产品（Corning），来源于Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤的细胞外基质，用于预涂塑料培养器皿（参见7.2.1节），但也可以凝胶方式应用。Matrigel由层粘连蛋白、胶原蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖和许多结合性生长因子组成，也可获得不含生长因子的制品。Matrigel已用作上皮形态发生的底物（Larsen et al.，2004），用于自内皮细胞形成毛细血管（Jain et al.，1997；Vouret-Craviari et al.，2004）（参见方案22.4节），以及用在肿瘤侵袭研究中（Brunton et al.，1997；de Wever et al.，2004）。然而，它是一种复合的、未完全定义的基质，能抑制一些形态发生事件，如肝细胞生长因子（HGF）诱导的MCDK细胞的管形成（Williams and Clark，2003）。

20.3.2 中空纤维

由于在高细胞密度时培养液供给和气体交换受到限制，研究者（Knazek et al.，1972；Gullino and Knazek，1979）由塑料毛细纤维管床发明了一种灌流室，目前这种灌流室可购买到（参见附加材料中的附录Ⅲ，中空纤维灌流培养）。这些纤维对于气体和营养物质有可渗透性，能支持细胞在其外表面上生长。将含有5% CO_2的培养液经毛细管的中心泵入，再将细胞加入纤维束周围的外室（图7.11、图21.8）。在毛细纤维管外面附着和生长的细胞经灌注液扩散获得营养，能达到组织样的细胞密度。不同的塑料和超滤特性不允许10kDa、50kDa或100kDa的分子通过，从而调节大分子的扩散。

可以断定，以这种高密度形式培养细胞的行为方式与体内一样。例如，在这种培养细胞中，绒毛膜上皮癌细胞比常规单层培养的细胞释放更多的人绒毛膜促性腺激素（Knazek et al.，1974），结肠癌细胞产生较多的CEA（Rutzky at al.，1979；Quarles et al.，1980）。然而，建立这些灌流室有着相当的技术难度，并且费用很高。此外，从这些灌流室采集细胞样本和确定细胞的浓度是困难的。但总体来说，中空纤维似乎为研究生物药品的合成和释放提供了一个理想的系统，目前正以半工业规模进行开发（参见21.2.5节）。这种灌流室也用作研究氧运输的模型（Chen and Palmer，2008）。

20.3.3 细胞球体

当分离的细胞在旋转混合器中培养时，这些细胞可再结合成簇。在再聚集过程中，自胚胎组织分离的细胞能以高度特异的方式分类（Linser and Moscona，1980）。在这些异型聚集物中的细胞似乎具有将其分成几群和形成组织样结构的能力。

同型的聚集物也相当容易发生，在旋转混合器中或生长在琼脂上形成的细胞球体（彩版18a）已用作体外化学疗法（Twentyman，1980）和恶性侵袭特性（Mareel et al.，1980）的模型。与器官培养一样，细胞球体的生长也受到扩散的限制。外层细胞的增殖与中心坏死保持平衡，从而达


彩版18

到一种稳定的状态（图 20.6）。

详见方案 20.2。

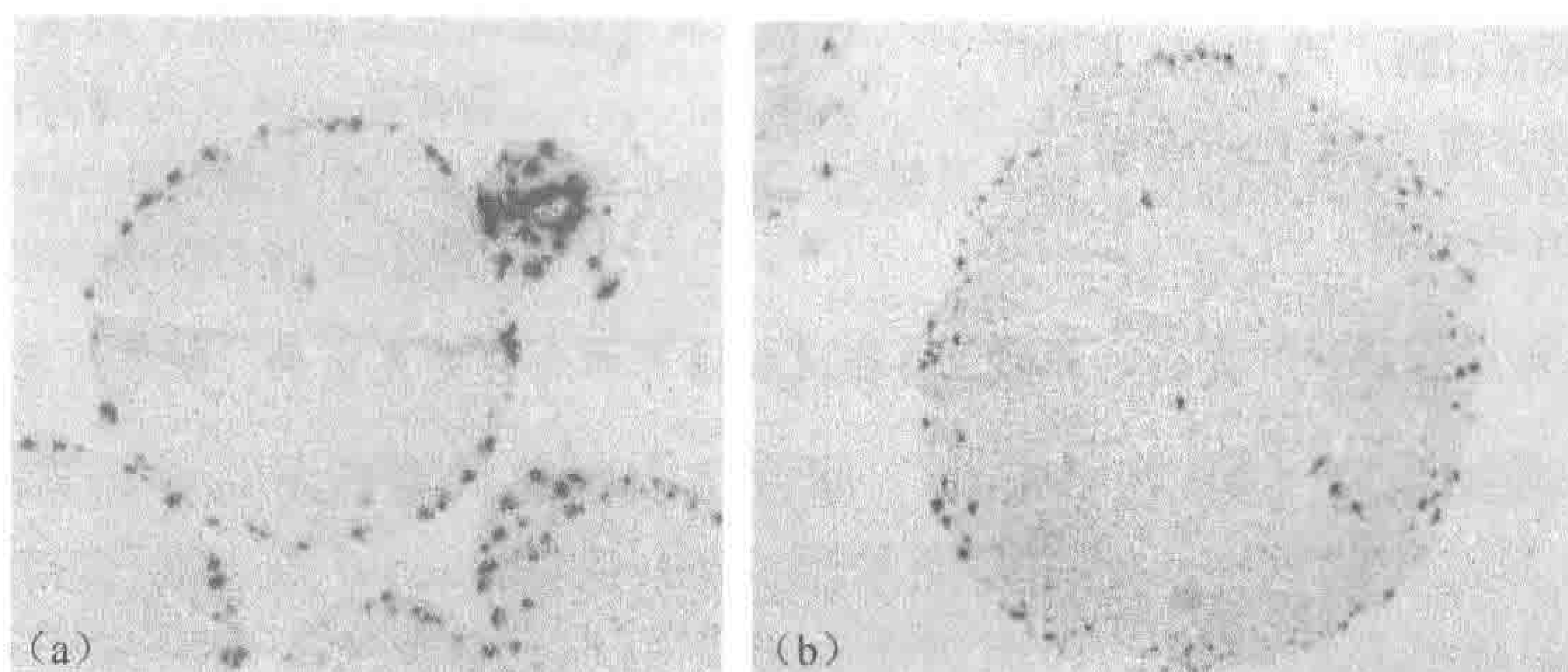


图 20.6 球体内的分裂细胞。成熟球体（直径为 600~800μm）的切面。(a) [^{3}H] 胸腺嘧啶核苷标记的放射性自显影显示只有外周部被标记；(b) 用抗 BUdR 抗体作免疫过氧化物酶染色，着色也仅在外周部（引自 Ali Neshasterez；见彩版 18a）


彩版 18

方案 20.2 细胞球体的三维培养

以下内容由 M. Boyd Experimental Targeted Radiation Therapeutics Group（Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Science, University of Strathclyde, Glasgow G61 1XQ, Scotland, UK）和 R. J. Mairs（Institute for Cancer Science，Glasgow University，Wolfson Wohl Building，Garscube Estate, Bearsden, Glasgow G61 1QH, Scotland）提供。

背景

多细胞肿瘤球体为血管微迁移提供了一个增殖模型。细胞球体的三维结构有利于药物通透性，以及对放射和化学治疗抵抗等方面的实验研究，这些研究取决于细胞间的接触。另外，细胞球体很好地适应于研究实验性打靶或基因疗法中的“旁观者效应”(Boyd et al.，2002，2004)。从已建立的细胞系或异种移植物比从原发性肿瘤更容易建立人肿瘤球体（Sutherland，1988）。

可将单细胞悬液（用胰蛋白酶消化的单层细胞或自肿瘤分离的细胞）中的细胞接种入磁力搅拌瓶中（Techne，见图 7.7），培养 3~5 天及以上，让小的聚集物形成（Boyd et al.，2001）。这个方案是最理想的，然而大多数细胞系用这种方式不形成球体。另外，聚集物可由静置培养瓶中的细胞悬液形成，这些培养瓶预涂琼脂。聚集物可以保留在原来的培养瓶中，或者一个个地转移（用滴管）到多孔培养板。在多孔培养板继续生长数周，可产生最大约 1000μm 的球体（Yuhas et al.，1977；Sutherland，1988）。

概要

用胰蛋白酶消化单层细胞或解离原有组织，将细胞接种到涂有琼脂的底物上。将聚集物转移到 24 孔培养板，进行分析。

材料

无菌

- 诺贝尔琼脂（BD Biosciences）

- 生长培养液
- 超纯水（UPW）
- 0.25%胰蛋白酶，用 PBSA 配制
- $25cm^2$ 培养瓶或 24 孔培养板
- 9cm Petri 培养皿

注意事项 涂布琼脂时，所有的培养瓶、培养板和培养皿都应是无菌的，但不需要达到组织培养级。

非无菌

- Pi 泵或等同的移液器

操作步骤

A. 用琼脂涂布 $25cm^2$ 培养瓶

1. 将 1g 诺贝尔琼脂加入 100mL 带有松螺旋盖的硼硅酸盐玻璃瓶中，瓶内装有 20mL UPW。
2. 在 100℃水浴中将琼脂加热 10min，或直至琼脂完全溶解。
3. 立即将瓶中的内容物加入预热至 37℃的 60mL 生长培养液中，然后分别按 5mL 量加入每个培养瓶中。保证琼脂内无气泡。
4. 将琼脂在室温条件下胶化约 5min，以准备 1.25%琼脂包被的培养瓶。

B. 用琼脂涂布多孔培养板

1. 将 0.5g 琼脂加入 10mL UPW 中，如涂布 $25cm^2$ 培养瓶的步骤 2 加热，然后加入 40mL 37℃的生长培养液。
2. 在 24 孔培养板的每个孔内加入 0.5mL 终溶液，准备 1%琼脂涂布的培养孔。精确和小心地加入是很重要的，以保证在随后球体的观察中很容易对各个孔进行显微镜聚焦。

C. 细胞球体的形成

1. 对于已建立的细胞系，用胰蛋白酶消化汇合的单层细胞（参见方案 12.3），或者使固体肿瘤细胞解离（参见方案 11.6、方案 11.7 和方案 11.9），以产生单细胞悬液。
2. 如果需要，可用含血清的培养液中和胰蛋白酶。
3. 用电子细胞计数器或血细胞计数板对细胞进行计数。
4. 在每个琼脂预涂的 $25cm^2$ 培养瓶中加入 5mL 含 $5×10^5$ 个细胞的生长培养液，然后培养细胞。如果细胞具有球体形成的能力，3~5 天可自发形成聚集的小簇（直径为 100~300μm）。
5. 为了便于以后的生长，应当将细胞球体移入新的 $25cm^2$ 培养瓶或 24 孔培养板。

D. 转移到 $25cm^2$ 培养瓶

1. 将原培养瓶中的培养物移入锥形离心管或普通容器中。
2. 让细胞球体沉降后，取出上清和单个的细胞。
3. 用新鲜培养液将球体再悬浮，然后将悬液移入新的琼脂预涂的培养瓶。球体可在这些培养瓶中通过外层细胞的分裂继续生长。

E. 转移到 24 孔培养板

1. 将每个 $25cm^2$ 培养瓶中的培养物移入 6cm Petri 培养皿。

2. 在24孔培养板的每个琼脂预涂的孔中，加入0.5mL培养液。

3. 在低倍镜（40×）下，逐个地选择一定大小的细胞球体。用塑料吸管和Pi-泵或借助具有适当微调的其他移液器，将选定的类似直径的细胞球体逐个移入琼脂预涂的24孔培养板的每个孔中。

4. 将24孔培养板放入CO_2培养箱。

5. 每周更换培养液1或2次，每次换液0.5mL。或每周1或2次加入培养液0.5mL（没有移出任何培养液），2~4周后培养液达到2mL/孔。

结果分析 用显微镜目镜测微尺或格栅定期地（如2~3次/周）测量细胞球体的直径，或更好地使用图像分析扫描仪（如Incucyte、Essen）测量横切面积，可对培养板孔或培养瓶中的球体生长作定量分析。当球体生长在培养板孔中并作逐个检测时，可获得最精确的生长曲线。

细胞球体也可用作药物处理后克隆形成力的分析。将细胞球体收集入通用容器中，用D-PBSA清洗，除去剩余的培养液，然后在37℃条件下用胰蛋白酶孵育5min。再将细胞悬液通过一个注射器针头，就可将细胞球体解聚形成单细胞悬液。将细胞计数，利用台盼蓝拒染法估计活细胞数目（参见方案24.1）。由此，细胞可用于常规克隆形成力分析（Boyd et al.，2001，2004）。

转染嵌合体球体 用不同基因转染的细胞也能长成球体。这些细胞首先以单层培养，然后用作基因转染，以筛选转染基因表达的细胞。通过以任何希望的比率加入转染的和非转染的单层细胞可形成嵌合性球体（Boyd et al.，2002，2004）。在所形成的球体内分布着不同的细胞群体，它们呈现大小不太均一的镶嵌斑块。如同在形成期加入细胞，在接近相同的嵌合体斑内形成的球体中分布有不同的细胞，维持转染与非转染细胞的相同比率（参见见彩版18a）。


彩版18

应用 细胞球体广泛地应用于无血管肿瘤生长模型（Ward and King，1997）、细胞群基因表达的三维立体构筑作用（Waleh et al.，1995；Dangles et al.，1997）和细胞毒性疗法的评价。治疗的结果包括生长延期、确定对治疗起作用（"治愈的"）球体的比率和伴随被治疗球体的解聚在单层细胞中的克隆形成（Freyer and Sutherland，1980；Boyd et al.，1999，2004）。一个重要领域是，应用球体研究细胞毒性药物、抗体或用于靶向疗法的其他分子的通透性（Sutherland，1988；Carlsson and Nederman，1989）。这一研究范畴显示出在单细胞悬液或单层细胞中不可能进行的特殊用途。在生物学标记的放射性核素引起的细胞杀伤的研究方面，也证实细胞球体是有用的（Mairs and Wheldon，1996；Boyd et al.，2001；Fullerton et al.，2004）。另外，细胞球体培养已用于对照实验，以评价由生长接近正常细胞培养物的恶性肿瘤细胞形成的球体的侵袭性（de Ridder，1997）。这些技术也已用于非肿瘤疾病过程的研究，如风湿性关节炎（Ermis et al.，1998）。

在评价旁观者效应方面，嵌合性球体是具有特殊用途的一种新的变异形式。例如，癌基因治疗的现行困难是基因转染操作的无效性，导致需要旁观者效应除去未被成功转染的肿瘤细胞。嵌合性球体在体外反映这种状态，使评价不同形式的旁观者效应成为可能，如当转染的细胞用放射活性因子标记时的放射杂交炉（Boyd et al.，2002，2004）。

20.3.4 悬滴培养

悬滴技术是培养组织块的最早技术之一，现在恢复用于3D细胞聚集培养，如细胞球体和类器官（Ylostalo et al.，2014）（见短篇综述20.1，图20.3）。原始的悬滴技术通过凝结的血浆固定组织块，用于植块培养和观察玻璃液体界面处的细胞长出。最近，悬滴技术已用于使小滴内未贴壁的细胞聚集起来。这种方法使用适合高通量检测的96孔板和384孔板，已应用于研究间充质干细胞的聚集及其对不同培养液的反应（Ylostalo et al.，2014）、肿瘤细胞的相互作用（Amann et al.，2014）

和抗肿瘤药物试验（Hsiao et al.，2011；Thoma et al.，2013）。

20.3.5 微载体

微载体将在21.2.3节详细叙述，但由于有孔微载体的可靠性（GE Life Sciences Cytopore 2），故微载体也在此叙述。有孔微载体允许细胞穿入里面的基质，因此将其看作三维生长微环境（图21.17）。有孔微载体为细胞扩增和规模三维培养提供了由结合纤维素的DEAE基团构成的支架。

20.3.6 类器官

类器官一词是指器官样结构，不过已应用于类似结构的许多不同培养物，但不必指微器官。类器官以三维聚集细胞而命名，常为几千个细胞，用不同器皿作悬浮培养。类器官可分为两类：①原代细胞聚集构成的类器官，未经过初始培养；②已建立的扩增细胞构成的类器官，如上述的球体（参见20.3.3节）。下列为构建类器官的方法。

（1）由原代解离细胞构成

（a）低速离心分离的经胶原蛋白酶消化的人乳腺组织（Labarge et al.，2007）。这些结构类似于末端导管小叶单位（TDLU），含有部分分化的上皮，并可能含有干细胞（图25.1）。

（b）从经胶原蛋白酶消化的人乳腺癌组织分离的上皮细胞聚集物（参见方案25.29-Su；图25.11）。这些结构可按单层细胞种植和培养达8周（Speirs，2004）。

（c）从人结肠直肠癌分离的上皮细胞聚集物（Freshney et al.，1982）。用粗胶原蛋白酶消化的癌组织在3T3细胞饲养层上形成附着的单层。这些培养物含有上皮细胞和间质，形成小结。小结最终脱落进入培养液，可扩增培养数周。

（d）通过胶原蛋白酶消化从CCl_4处理的小鼠肝分离的胆管。用Matrigel培养。这些类器官可扩增培养达8个月，可以用不同培养液培养，可含有肝干细胞或诱导分化为肝细胞（Huch et al.，2013）。

（e）通过胶原蛋白酶消化从小鼠胰腺分离的导管。作为类器官可扩增培养数周，保留双能干细胞。在合适培养中，这些干细胞可分化成腺泡细胞和内分泌细胞（Huch et al.，2013）。

（f）从人胚泡分离的干细胞。这些干细胞可扩增和保留干细胞特性，能够形成高密度集落（参见方案26.3）。如果在悬浮培养条件下生长成聚集物，这些细胞构成胚体。在添加确切诱导因子条件下接种于Matrigel上，这些胚体趋向分化（Cooke and Minger，2007）。

（2）由扩增的分散细胞再聚集

（a）悬滴培养技术。生长在悬滴内细胞能够趋向形成聚集物（参见短篇综述20.1）。按此构型种植的卫星细胞保留卫星细胞表型，并不分化（Archacka et al.，2014）。另外，不同来源的干细胞能够生长成"微组织"，这适合于心脏细胞疗法（Emmert et al.，2013）。在悬滴培养条件下，小鼠诱导性多能干细胞构成胚体，这些胚胎样体可分化成内皮细胞（Hibino et al.，2012）。

（b）NASA生物反应器内零重力刺激培养。在小室内以合适速度旋转时，细胞不沉降而在悬浮状态下生长成三维聚集物。在这些条件下，培养的猪肝细胞的分化增强（Nelson et al.，2010），骨髓源性细胞形成软骨更有效（Sakai et al.，2009），小鼠胚胎干细胞形成的胚体向心肌细胞分化增强（Rungarunlert et al.，2013）。

(c)细胞球体。可通过将连续细胞系种植在非黏附性表面上建立三维培养物(参见20.3.3节)。

作为增强分化的方法，三维培养已提出多年了（参见20.1节）。这些细胞培养物呈现的重要特性是建立特殊的微环境或细胞巢，依赖于用于培养的基质和可溶性因子促进干细胞增殖和成熟，形成分化后组织。因此，三维培养能够建立确切的几何结构和细胞相互作用，从而可使细胞更确切表达特殊表型，无论干细胞、祖细胞或分化后细胞。

20.3.7 转动室系统

在转动室悬浮生长的细胞可以支持聚合成球体。通常附着的细胞如果不附着到底物上便可以相互附着。在这些条件下，杂交瘤也趋向于形成球体。

MiniPERM生物反应器 这是一个双池转动室培养系统（图20.7），即两池的圆柱体，细胞位于小池，培养液位于大池。如果将细胞悬液局限于一个小池内，通过可渗透膜（Sarstedt）与大池的培养液分开。不用大量培养液稀释细胞时，细胞的浓度可能相当高。在通用转动装置上快速旋转时可防止积聚。当用作生物反应器时，来自杂交瘤的抗体等产品在细胞池中积聚，而营养物质和代谢产物通过可渗透膜扩散进出培养液池。将其转动以保证搅匀，能够喷洒或置换培养液而不干扰细胞或产品。缓慢转动有利于细胞聚集，这可促进细胞分化。

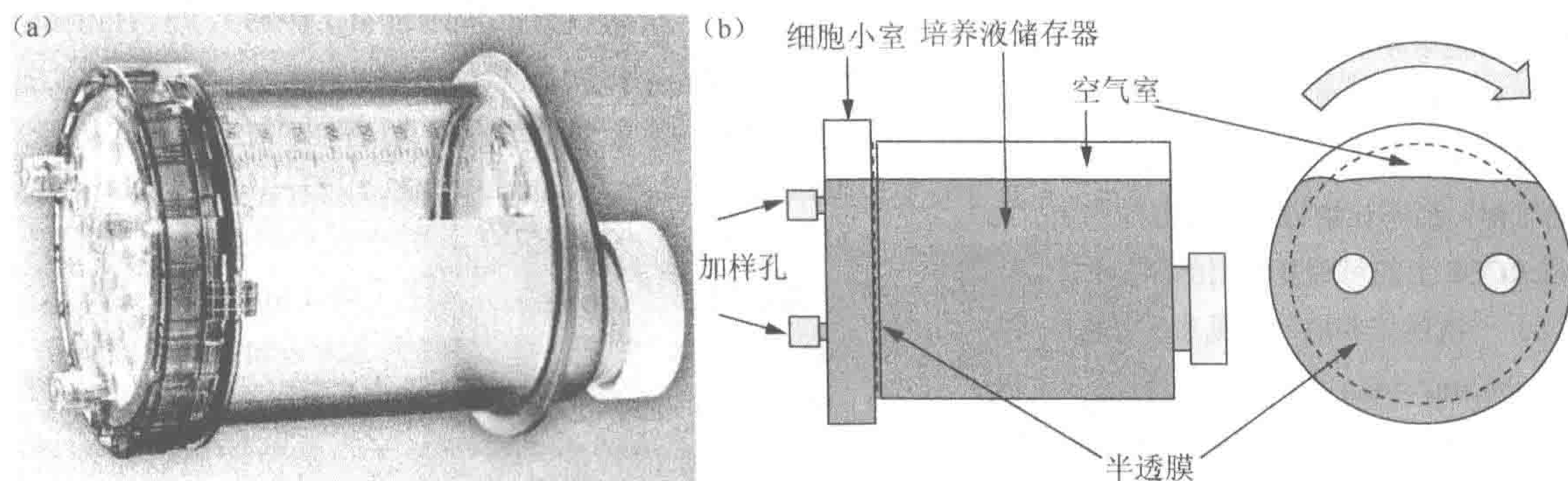


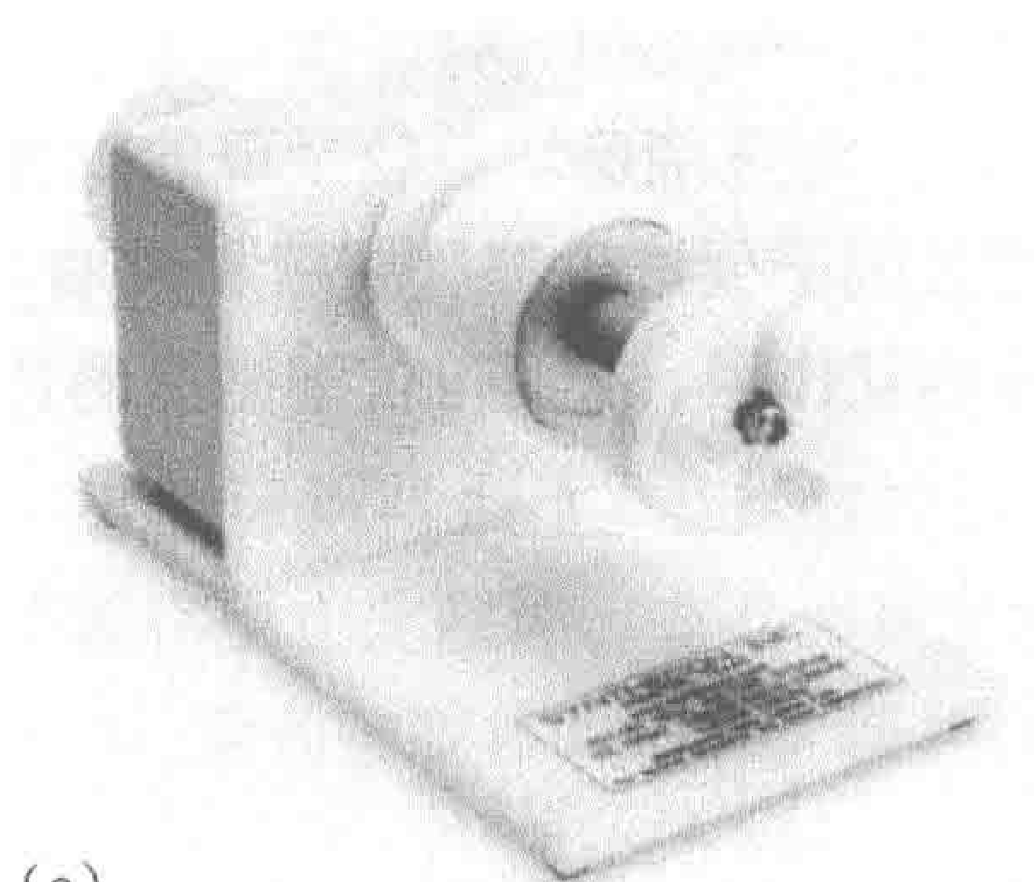
图20.7 Miniperm生物反应器。(a) Miniperm生物反应器照片，(b) Miniperm生物反应器截面。左侧小室内的浓缩细胞悬液借半透膜与培养液室分开。高分子产品（>12.5 kDa）和细胞在一起，可经样品孔收集产品，而培养液经右侧孔置换。通过转动滚轴架上的小室可混匀培养液（引自 Sarstedt）

旋转细胞培养系统（RCCSTM）在微重力状态下培养细胞的概念令人感兴趣。在20世纪80年代，NASA设计了旋转培养池。细胞在旋转培养室呈悬浮生长，通过缓慢旋转达到模仿的无重力状态。旋转的培养室连续改变沉降向量（图20.8和彩版22c）。细胞呈静止状态，易受零切力影响，趋向形成三维聚集物即球样结构。此结构中的细胞分化良好，并伴有产品形成增多（NASA生物反应器会议记录，1997）。在含有细胞的圆柱体内，通过中央的硅胶膜进行气体交换。当旋转停止时，细胞聚集物沉降下来，可置换培养液。这种生物反应器适合于作为一次性RCCS单位或可重复利用的慢旋转侧管（STLV），可从Synthecon公司购买。


彩版22

除了最初的目的之外，这种旋转培养系统还可用于测定微重力对于细胞的影响，从而应用于空间计划（Freed and Vunjak-Novakovic，2002），这种培养系统也为组织工程构建时大批量培养提供了合适的生物反应器（Dutt et al.，2003；Vunjak-Novakovic，2006）。


彩版18


(a)

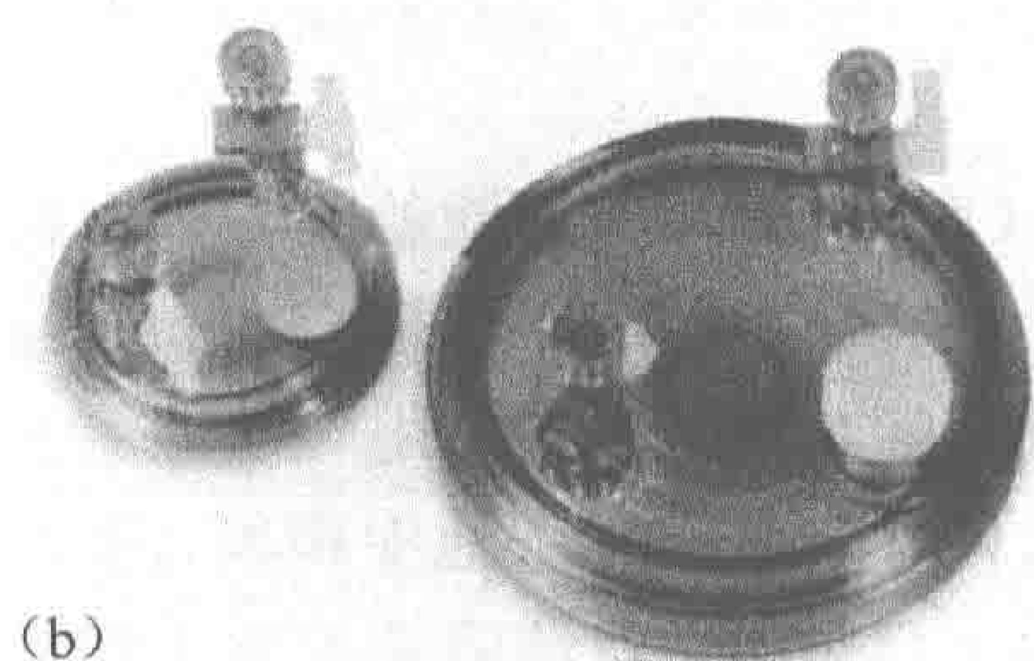

(b)

图 20.8 Synthecon 旋转细胞培养系统。在旋转细胞培养系统（RCCS），通过调节圆柱形培养池的旋转速度维持细胞的悬浮生长。通过气体可渗透性硅胶膜的孔供给细胞充足的气体，而不让切力引起气泡的产生。(a) 在 RCCS 上的可重复使用的圆柱形培养池；(b) 一次性培养池（另见彩版 22c）。可从 Synthecon，Inc.，Houston，Texas 及各国分公司购买 NASA 设计的生物反应器（得到 Synthecon Inc.的许可）


彩版22

20.3.8 藻酸盐活细胞固定术

在藻酸盐微珠内包被活细胞的技术已广泛地用在产物形成的实验研究中，如用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞（Dubrot et al.，2010）、糖尿病治疗动物模型中的激素形成细胞（Zimmermann et al.，2003）和软骨细胞分化（Lemare et al.，1998）（也见方案 25.16，彩版 18b）。

20.3.9 滤膜小皿插件

滤膜小皿插件是基于滤膜的培养系统，其商业化可追溯到 20 世纪 50 年代，此后以各种形式被广泛应用。滤膜底物为研究细胞相互作用、分层、极性和组织构型提供了培养环境。能够建立组织的极性和功能完整性，如甲状腺（Chambard et al.，1983）、肠（Halleux and Schneider，1994）和肾（Mullin et al.，1997）、上皮（参见 19.7.4 节）。滤膜培养可产生复层的表皮（Limat et al.，1995；Kondo et al.，1997；Maas-Szabowski et al.，2000，2002）。也有人用滤膜小皿插件研究了粒细胞或恶性肿瘤细胞的侵袭性（McCall et al.，1981；Elvin et al.，1985；Repesh，1989；Schlechte et al.，1990；Brunton et al.，1997）（参见 22.5.3 节）。

滤膜小皿插件的主要优点之一是使细胞以组织样高密度进行培养，易于达到培养液与气体的交换，并呈多重复形式（方案 20.3）。在有或没有基质成分条件下，滤膜小皿插件也可使多种不同类型细胞再结合（图 20.9，见 20.4 节）。目前，滤膜小皿插件可从几家供应商购买到（参见补充材料中的附录III）。滤膜小皿插件用多种半透明或透明材料制成，包括聚碳酸酯、PTFE 和聚乙烯对苯二甲酸三酯（PET）。大小为 6.5mm~9cm，适合于 24 孔、12 孔和 6 孔板或更大的培养皿（图 20.9、图 20.10，也见彩版 19~21，表 20.3）。可购买到用胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白或 Matrigel 预涂的滤膜小皿插件。


彩版19

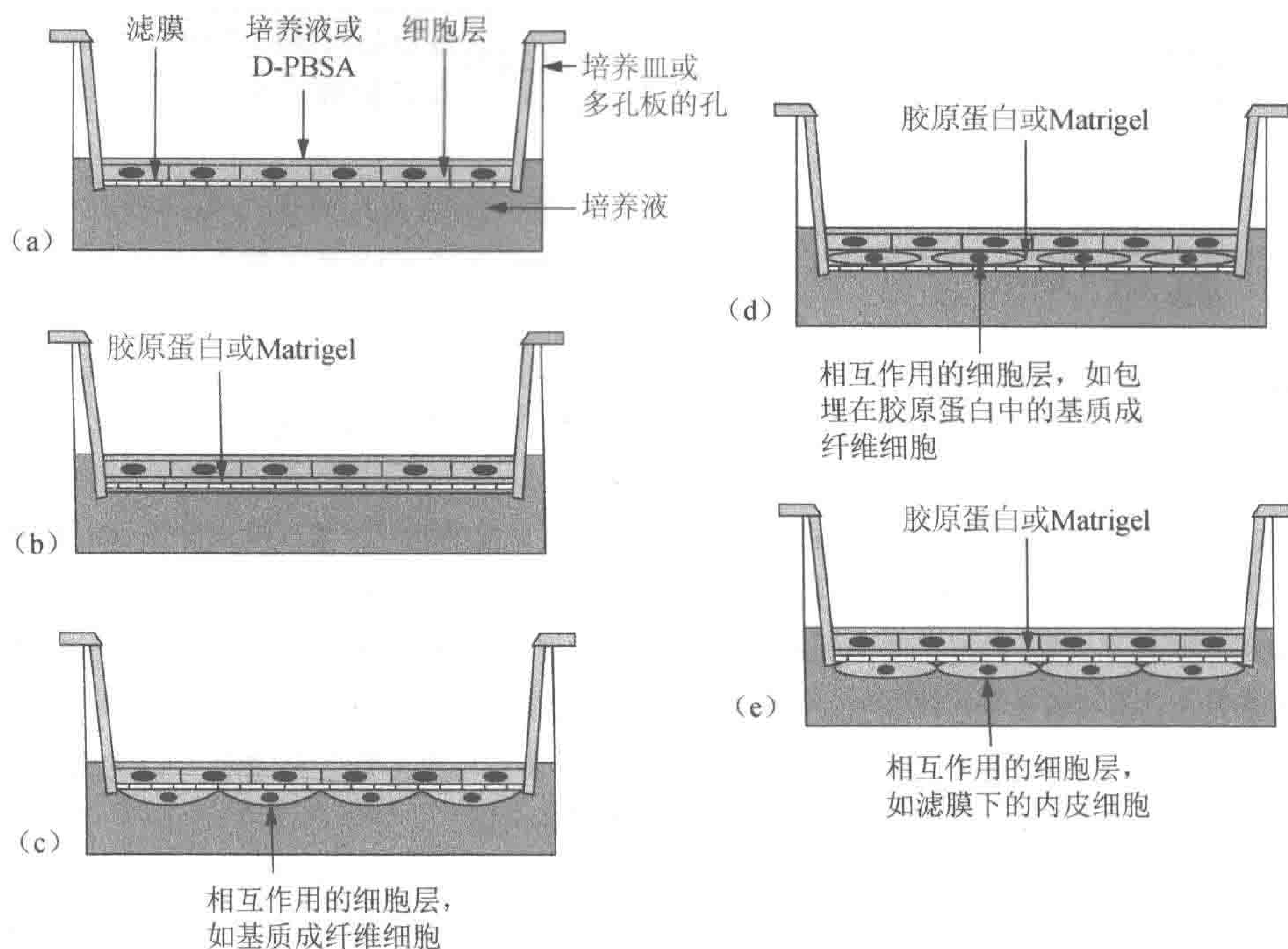

彩版20


彩版21

方案 20.3 滤膜小皿插件

概要

将细胞接种入滤膜小皿插件内，在多孔培养板中以过量的培养液进行培养。




彩版19


彩版20


彩版21

图 20.9 滤膜小皿插件。一个假设的滤膜小皿插件的切面图解。（a）生长在滤膜上的单层细胞；（b）生长在滤膜上面基质上的单层细胞；（c）附加到滤膜下面的相互作用细胞层；（d）附加到基质的相互作用细胞层；（e）附加到滤膜下面的相互作用细胞层并在上面涂布基质（另见彩版 19~21）



图 20.10 Transwells。12 孔培养板中的滤膜小皿插件。在旁边有一个滤膜小皿插件（Transwells：Corning）

材料

无菌或无菌制备

- 每平方厘米滤膜约 0.5×10^6 个细胞
- 生长培养液，每个滤膜 1~20mL（取决于安置滤膜的器皿的大小）
- 滤膜小皿插件

- 放置滤膜小皿插件的多孔培养板：6孔、12孔或24孔
- 弯头镊

非无菌

- 滴管

操作步骤

1. 将滤膜小皿插件放入培养板或培养皿中。

2. 加入培养液，将培养皿倾斜，使培养液充满滤膜下方的空间，尽量置换出空气。加培养液至滤膜水平（6孔板每孔2.5mL；24孔板每孔1.0mL）。

3. 将培养板水平放置，在直径为25mm的滤膜上加入2mL含有2×10^6个细胞的培养液，在直径为6.5mm的滤膜上加入200μL含有5×10^5个细胞的培养液，小心不要穿破滤膜。

4. 将培养板放在保护盒中，然后置于湿润的CO_2培养箱中培养（参见5.5.2节）。关键是避免振荡保护盒，而且培养物不应在培养箱中移动，以免溢出和引起污染。

5. 在3~5天可形成单层，虽然组织型分化如极性转运可能需要5~10天或更长时间建立。

6. 可无限制地维持培养，每3~5天更换培养液或将滤膜小皿插件转移到新的培养孔或培养皿。

应用和分析

（1）通透性。有些上皮细胞（如MDCK和Caco-2）和内皮细胞（如脐静脉内皮细胞）在达到汇合后几天形成紧密连接。用胶原蛋白将滤膜预处理后可促进这一过程。跨上皮通透性的生理性细胞转运调节受到限制，细胞周围的转运降低至接近于零。可通过观察染料（如虫荧光素黄）、[^{14}C]-甲基纤维素或[^{14}C]-菊粉的跨膜转运或通过增加跨上皮电阻（TEER）模拟这个过程。

（2）极性转运。将标记的葡萄糖或氨基酸加入滤膜小皿插件的上室，可出现向下室的单向转运。如果加入到下室的细胞含有P-糖蛋白或其他某种扩散转运物质，加入下室的细胞毒素（如长春碱）可转运至上室，但不能反向转运。

（3）细胞穿经滤膜。用胰蛋白酶消化后，依次计数滤膜两面的细胞（胰蛋白酶消化下来的细胞将不能通过甚至8μm孔径的滤膜，因为这些细胞在悬液中的球形直径超过这个尺寸），或者将滤膜固定、包埋和切片，然后经电镜或常规组织学方法观察。将在载玻片上面固定和染色（Giemsa）的滤膜用DPX整体封固在盖玻片下方，通过加压使滤膜展平，以便能够进行整体观察。然后，可通过改变不同平面上的焦距进行相应的计数。

（4）从滤膜脱落到培养皿底的细胞。经胰蛋白酶消化或仔细观察计数细胞。

（5）膜上和膜下的细胞。按照步骤3计数细胞，也用罗丹明或异硫氰酸荧光素预标记细胞（胰蛋白酶消化后悬液内的浓度为5μg/mL，标记30min），然后测定用胰蛋白酶从滤膜两面上消化下来的解离细胞（用0.3mol/L NaOH配制的0.1% SDS处理细胞30min）的荧光强度。荧光标记计数细胞时应避免当荧光保持不变时细胞重叠在下室，而不考虑重叠。

（6）细胞侵袭。在滤膜上预先准备细胞层（正常的成纤维细胞、角质形成细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等）（见22.5.3节，表22.1），通过显微镜观察确认细胞形成汇合的单层，然后将用EDTA分离的实验细胞接种到预先准备的单层细胞（1×10^5~1×10^6个/滤膜）上。如果实验细胞是RITC或FITC标记的，荧光检测可显示滤膜下面细胞的形态。

（7）基质侵袭。用Matrigel涂滤膜，将细胞接种于Matrigel上面，然后检测至滤膜下面细胞

的形态（Repesh，1989；Schlechte et al.，1990）。另外，将细胞接种于滤膜下面，用 Matrigel 涂滤膜上面，然后用共聚焦显微镜检测细胞向 Matrigel 中的侵袭（Brunton et al.，1997）。

其他说明

（1）培养液的深度。滤膜上方的培养液深度可在细胞水平调节氧张力。角质形成细胞或来自肺泡的II型肺泡细胞需要少量的培养液和高氧张力，而肠上皮细胞如 Caco-2 最好浸没和处于低氧张力状态。

（2）滤膜的孔径。1μm 孔径滤膜使细胞相互作用和接触，但不能穿过滤膜。8μm 孔径滤膜允许活细胞穿过滤膜。0.2μm 孔滤膜不能使细胞发生接触。小孔径的滤膜可用于在不使细胞混合的情况下研究细胞间的相互作用。

（3）跨滤膜的细胞结合。将滤膜小皿插件反转，上面朝下放入 Petri 皿内。将 0.5mL 细胞悬液（$2×10^6$ 个/mL）加于滤膜下面（现在朝上）。在全部培养液流经滤膜之前，将盖放在培养皿上面，使盖接触细胞悬液。培养皿的深度需比滤膜小皿插件的高度大 0.5~1mm，以便使盖和滤膜之间存在微隙。将滤膜孵育 18h。微隙能吸引培养液和细胞，直至细胞沉降到滤膜上并附着（Brunton et al.，1997）。次日，按照上面的（7）所述，反转滤膜，在上面接种相互作用细胞或涂 Matrigel（也见方案 20.3）。

20.3.10 神经聚集物的培养

在 20 天培养过程中，细胞聚集物可变为球形，发育形成器官样结构（方案 20.4）。

方案 20.4 神经聚集物

该方案由 Rolf Bjerkvig（Department of Cell Biology and Anatomy, University of Bergen, Zrstadveien 19, N-5009 Bergen, Norway）提供。

胎儿脑细胞的聚集培养物已广泛应用于研究神经细胞的分化（Trapp et al.，1981；Bjerkvig et al.，1986b；Jackson et al.，2007）。复合结构也已经从多潜能干细胞获得（Lancaster et al.，2013）。聚集的细胞允许按照在体内观察到的相同发育顺序，形成由成熟的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞组成的器官样结构。神经纤维网也明显形成。在肿瘤生物学方面，细胞聚集物可用于脑肿瘤细胞侵袭的体外研究（Bjerkvig et al.，1986a）。

概要

从妊娠 17 天或 18 天的胎鼠取出脑（与地方动物伦理委员会联系，见 6.9.1 节），将脑制成单细胞悬液。通过在用琼脂预涂的多孔培养板中培养，使脑细胞形成聚集物。在 20 天的培养过程中，聚集物中的细胞形成成熟的器官样脑结构。

材料

无菌

- Dulbecco 改良的 Eagle's 培养液，含有 10%无热源活性的新生牛血清、4 倍所述浓度的非必需氨基酸、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素

- 含 Ca^{2+}和 Mg^{2+}的磷酸缓冲盐溶液（PBS）
- Ⅱ型胰蛋白酶（0.025%，用 PBSA 配制）
- 琼脂（Difco）
- 多孔组织培养板（24 孔培养板；Nunc）
- 10cm Petri 培养皿
- 12mL 试管
- 手术刀、解剖剪和外科镊
- 100mL Erlenmeyer 烧瓶（锥形瓶）2 个

非无菌

- 水浴箱

操作步骤

1. 用琼脂培养液涂多孔培养板的孔。

(a) 在 Erlenmeyer 烧瓶中制备 3%琼脂储存溶液（每 100mL PBSA 中加入 3g 琼脂）。

(b) 在沸水中将烧瓶加热直至琼脂溶解。在沸水中放一个空 Erlenmeyer 烧瓶，将 10mL 热琼脂溶液注入此烧瓶中。

(c) 向烧瓶内慢慢加入预温的完全生长培养液，直至培养液在琼脂内的浓度达到 0.75%。

(d) 在多孔培养板的每个孔内加入 0.5mL 温培养液-琼脂溶液。

(e) 使琼脂冷却和胶化。

这些多孔培养板可在冷藏箱内储存 1 周。

2. 在无菌条件下，从妊娠 17 天或 18 天胎大鼠的同窝仔切出整个脑，然后将脑组织放入含 D-PBSA 的 10cm Petri 培养皿中。
3. 用手术刀将组织切成约 $0.5cm^3$ 小块。
4. 将组织块移入一个试管，用 D-PBSA 洗 3 次。每次清洗之间让组织沉降至管底。
5. 向组织内加入 5mL 胰蛋白酶溶液，在 37℃水浴箱中消化 5min。
6. 用 Pasteur 吸管吹打约 20 次，将组织分散。
7. 让组织沉降 3min，然后将无组织块的混着细胞悬液移入含 5mL 生长培养液的试管内。
8. 向未分散的组织加入 5mL 新鲜的胰蛋白酶溶液，重复消化和分散步骤 2 次以上。
9. 将细胞悬液离心（200g，5min）。
10. 吸去上清液，用 10mL 生长培养液混悬和收集细胞。
11. 计数细胞，在每个涂琼脂的孔内加入 1mL 细胞悬液（3×10^6 个细胞）。
12. 将多孔培养板放入 CO_2 培养箱，培养 48h。
13. 将细胞聚集物移入无菌的 10cm Petri 培养皿中，并加入 10mL 生长培养液。
14. 用 Pasteur 吸管将大的聚集物分别移到新的涂有琼脂的多孔板。
15. 每 3 天更换培养液 1 次。小心地吸去原有培养液，添加新鲜培养液，覆盖聚集物。

结果分析 固定标本，用石蜡或树脂包埋，进行普通显微镜或电镜观察。通过透射电镜观察或髓碱性蛋白、胶质原纤维酸性蛋白和神经特异性烯醇化酶的免疫组织化学定位，可鉴定少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元。

其他说明 用不锈钢网或尼龙网作机械性过滤可获得单细胞悬液（Trapp et al.，1981）（见

11.3.8 节）。利用旋转振荡器也可获得再聚集的培养物。选择约 70r/min 的转速，以致将细胞带入旋涡中，从而大大增加细胞间相互碰撞的次数。另外，这种运动可防止细胞附着于培养瓶。

20.4 器官型培养

涉及不同细胞谱系重建的高密度、三维培养可称为器官型培养，用此术语将这些重建技术与器官培养相区别，在器官培养中原来的细胞不被分离。与组织型培养区别的关键事件是在这些构筑介绍异种细胞相互作用，包括可扩散的旁分泌作用和涉及细胞外基质的信号。这些细胞的相互关系允许形成结构性微环境、细胞极性和促进分化。器官型培养可通过混合少量的细胞并允许其相互作用和分类而建立（参见方案 20.4），正如用胚胎干细胞特别能够自发地发生一样（Linser and Moscona，1980），或者这种构筑可以设计保持相互作用细胞分开，以便可以研究它们的相互作用（参见 20.3.9 节）。

通常器官型培养需要结构性基质，类似于在上面（参见 20.3 节）通过广泛使用的滤池技术所叙述的（参见方案 20.3）。

20.4.1 组织等同物

受到商业性产品利用的推动，滤池技术的问世推动了器官型培养方法研究方面的迅速发展。已用介于其间的胶原蛋白层或掺入胶原蛋白的真皮成纤维细胞（Limat et al.，1989；Maas-Szabowski et al.，2000，2002；Stark et al.，2004，2006）（彩版 20）将真皮与表皮进行复合培养，产生了皮肤等同物（MattekEpiderm，Episkin，SkinEthic；见彩版 21）。另外，有人利用肺（Speirs et al.，1991）、前列腺（Thomson et al.，1997）、乳腺（Van Roozendahl et al.，1992；Gomm et al.，1997）和角膜（Griffith et al.，1999）的细胞建立了生长与分化的旁分泌调控模型。


彩版 20


彩版 21

重建原有组织是构建组织等同物的主要限制。原有组织的几何构型简单，如表皮角化细胞位于真皮成纤维细胞上面，这个容易达到。然而，各种组织成分之间的关系复杂，如血管和神经分布，故难以将合适类型的细胞和正确的几何构筑结合起来。但是，生物打印的发明使细胞定位甚至在复杂构筑中排布成为可能（Tasoglu and Demirci，2013；Murphy and Atala，2014）。

异种细胞相互作用的可能性也为在体外研究炎症和刺激（参见彩版 21；也见 24.6 节），以及建立其他与体内相关的组织相互作用模型（Emura et al.，1997；Gomm et al.，1997）提供了许多机会。

20.4.2 组织工程

组织等同培养物的构建也使组织置换疗法成为可能。皮肤等同培养物已用于烧伤修复（Limat et al.，1989；Gobet et al.，1997；Wright et al.，1998；Markeson et al.，2013），目前组织工程正应用于许多不同部位组织的代用品构建，包括软骨、骨、韧带、心肌、骨骼肌、血管、肝和膀胱（Atala and Lanza，2002；Vunjak-Novakovic，2006）（参见短篇综述 26.2）。正如器官型培养需要细胞相互作用，组织工程的构建常需要类似的细胞相互作用，如血管构建方面的内皮与平滑肌相互作用（Klinger and Niklason，2006），在阴道构建方面上皮与平滑肌相互作用，构建具有正常性功能的阴道是可能的（Rayr-Rivera et al.，2014）。除生物学相互作用外，一些构建物需要物理作用。骨骼肌需要张力（Shansky et al.，1997；Powell et al.，2002；Shansky et al.，2006），骨（Mullender et al.，2004）和软骨（Seidel et al.，2004）需要压力，血管构建物的内皮需要搏动性液体流动（Niklason et al.，2001）。

组织构建的工程化取决于组织依赖的各种成分。

（1）合适谱系的组织细胞，处于增殖和祖细胞阶段。

（2）相互作用的细胞，如皮肤构建中的真皮成纤维细胞、血管构建中的平滑肌细胞、神经构建物中的神经胶质细胞。

（3）支持组织结构的生物可降解支架，如聚乙醇酸（PGA）、聚乳酸（PLA）、蚕丝、磷酸钙（图 20.11）。

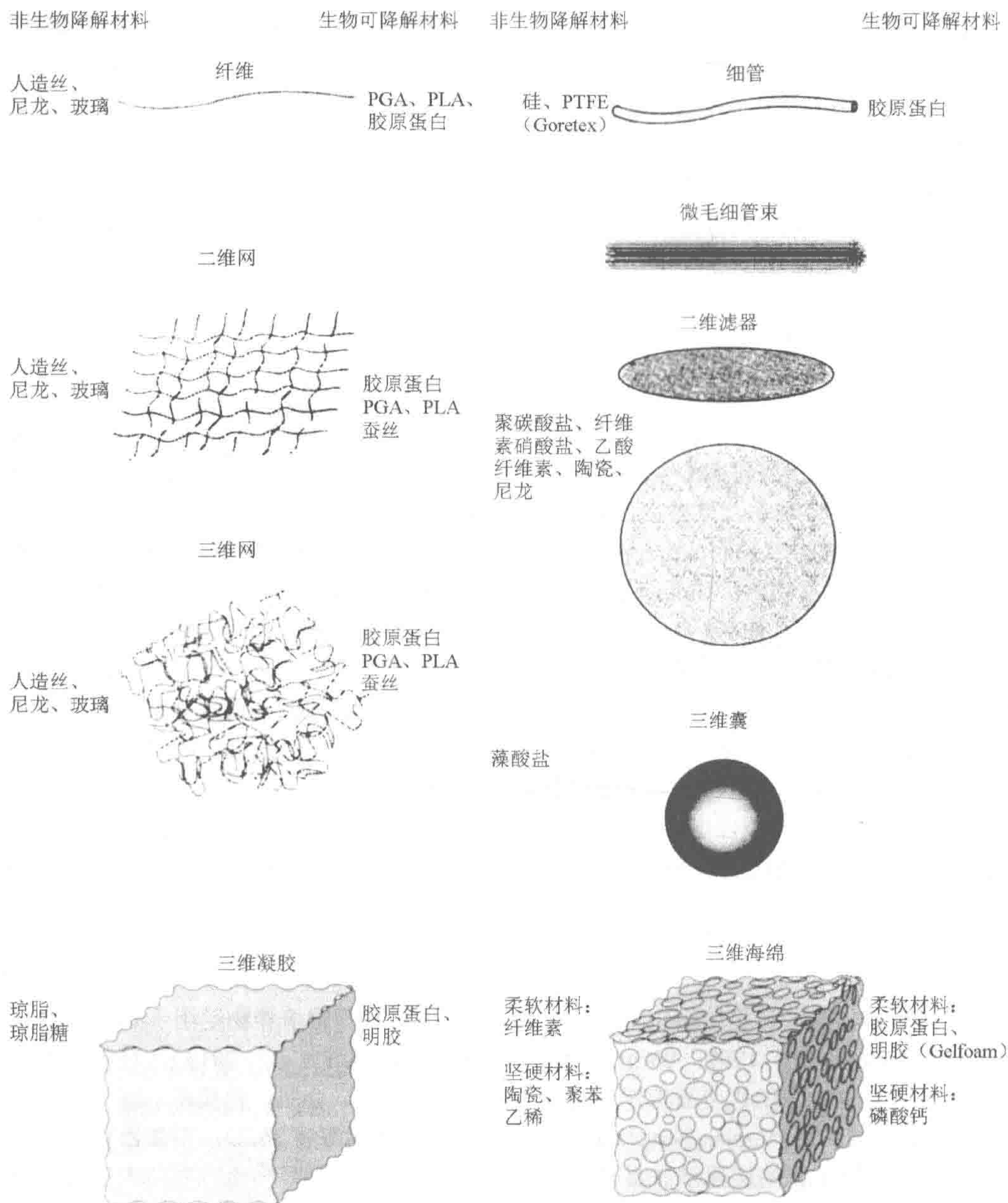


图 20.11 支架和基质。用于组织工程性构建物的支架和基质的种类。已应用了许多不同几何形状的材料，包括线形纤维或细管（上图）、二维的网板或滤片（中间图）和三维的立方体或球体（下图）。尽管非降解材料（每列图左侧的标记）已被应用，但趋向于应用生物降解支架（每列图右侧的标记），如胶原蛋白、明胶、聚乙醇酸（PGA）或聚乳酸（PLA）和磷酸钙等

（4）基质，如胶原蛋白，为软组织代替支架，或者包被支架以增强细胞附着。

（5）机械性应力，即肌张力、软骨和骨的压力和血管搏动力。

神经细胞已用于组织重建，如脊髓修复，但是在这些情况是将细胞悬液注入损伤部位，而不是构建物（Groves et al.，1993；Franklin et al.，1996；Franklin and Barnett，2000；Wewetzer et al.，2002；Totoiu et al.，2004）。

20.5 三维构建物中细胞的成像

将细胞整合入三维器官型构建物中的支架内时，难以用显微镜观察，故需用复杂的成像方法观察到构建物中细胞的状态。通过一些成像技术如 FISH，可以使固定组织、器官，甚至整个动物清晰可见（Boutin and Hoffman-Kim，2014；Yang et al.，2014）。新技术具有更大的穿透力和较小的损伤，如带有三维重建软件的双光子成像。该技术能够在小鼠肠器官培养物中观察到绒毛发育（Walton and Kolterud，2014），数字扫描高倍显微镜术能够使培养的整个小鼠原肠胚成像（Ichikawa et al.，2013）。这些在三维培养中使用的技术需求不仅用于形态形成和肿瘤侵袭研究（Scanlon et al.，2013），而且用于高通量筛选时对这些培养物的分析。

若将含有构建物的生物反应器放入 NMR 检测仪内，通过 NMR 检测可获得活组织构建物的非侵入性图像。能够以 MRI 显示检测结果（图 20.12）（Neves et al.，2003），并可分析发射光谱（图 21.21）。

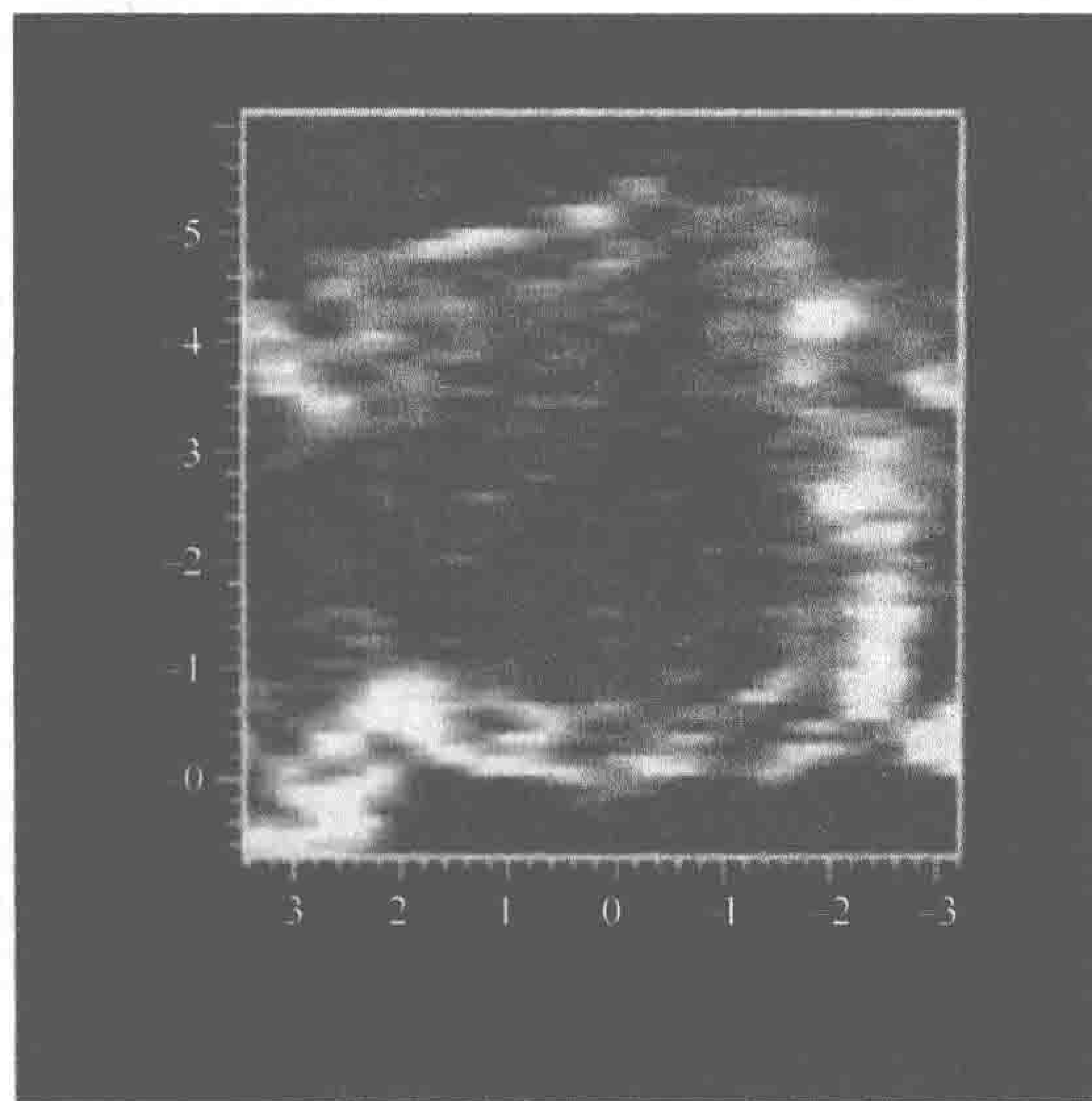


图 20.12 软骨构建物的 MRI。图像亮度与细胞密度成比例。标尺的距离以毫米表示

（经 Kevin Brindle 博士的许可，引自 Thelwell et al.，2001）

参考文献

Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, Vogel GF, Blumer M, Koeck S, Pechriggl EJ, Kelm JM, Hilbe W, Zwierzina H (2104). Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour–stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE* **9**(3):e92511.

Archacka K, Pozzobon M, Repele A, Rossi CA, Campanella M, De Coppi P (2014). Culturing muscle fibres in hanging drop: A novel approach to solve an old problem. *Biol. Cell* **106**:72–82.

Atala A, Lanza RP (2002). *Methods of tissue engineering*. San Diego: Academic Press.

Auerbach R, Grobstein C (1958). Inductive interaction of embryonic tissues after dissociation and reaggregation. *Exp. Cell Res.* **15**:384–397.

Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M, Taylor-Papadimitriou J (1992). Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells:The role of the alpha 2 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **102**:437–446.

Biggers JD, Gwatkin RBC, Heyner S (1961). Growth of embryonic avian and mammalian tibiae on a relatively simple chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* **25**:41.

Bjerkvig R, Laerum OD, Mella O (1986a). Glioma cell interactions with fetal rat brain aggregates *in vitro*, and with brain tissue *in vivo*. *Cancer Res.* **46**: 4071–4079.

Bjerkvig R, Steinsvag SK, Laerum OD (1986b). Reaggregation of fetal rat brain cells in a stationary culture system; I: Methodology and cell identification. *In Vitro* **22**:180–192.

Boutin ME1, Hoffman-Kim D (2014). Application and assessment of optical clearing methods for imaging of tissue-engineered neural stem cell spheres. *Tissue Eng. Part C Methods.* 21:292–302. (PMID: 25128373).

Boyd M, Cunningham SH, Brown MM, Mairs RJ, Wheldon TE (1999). Noradrenaline transporter gene transfer for radiation cell kill by [I] meta-iodobenzyl-guanidine. *Gene Ther.* **6**:1147–1152.

Boyd M, Mairs RJ, Cunningham SH, Mairs SC, McCluskey AG, Livingstone A, Stevenson K, Brown MM, Wilson L, Carlin S, Wheldon TE (2001). A gene therapy/targeted radiotherapy strategy for radiation cell kill by [I]MIBG. *J. Gene Med.* **3**: 165–172.

Boyd M, Mairs SC, Stevenson K, Livingstone A, Clark AM, Ross SC, Mairs RJ (2002). Transfectant mosaic spheroids: A new model for evaluation of tumour cell killing in targeted radiotherapy and experimental gene therapy. *J. Gene Med.* **4**: 1–10.

Boyd M, Mairs RJ, Keith WN, Ross SC, Welsh P, Akabani G, Owens J, Vaidyanathan G, Carruthers R, Dorrens J, Zalutsky MR (2004). An efficient targeted radiotherapy/gene therapy strategy utilising human telomerase promoters and radioastatine and harnassing radiation-mediated bystander effects. *J. Gene Med*, **6**: 937–947.

Brunton V, Ozanne B, Paraskeva C, Frame M (1997). A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an *in vitro* model for the progression of colon cancer. *Oncogene* **14**:283–293.

Carlsson J, Nederman T (1989). Tumour spheroid technology in cancer therapy research. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **25**:1127–1133.

Chambard M, Vemer B, Gabrion J, Mauchamp J, Bugeia JC, Pelassy C, Mercier B (1983). Polarization of thyroid cells in culture: Evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J. Cell Biol.* **96**:1172–1177.

Chen G, Palmer AF (2009). Hemoglobin-based oxygen carrier and convection enhanced oxygen transport in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**:1603-1612.

Cooke JA, Minger SL (2007). Human embryonal stem cell lines: derivation and culture. In Freshney RI, Stacey GN, AuerbachJM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 24–59.

Cooper GW (1965). Induction of somite chondrogenesis by cartilage and notochord: A correlation between inductive activity and specific stages of cytodifferentiation. *Dev. Biol.* **12**:185–212.

Cukierman E, Pankov R, Yamada KM (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:633–639.

Dame MK, Bhagavathula N, Mankey C, Dasilva M, Paruchuri T, Aslam MN, Varani J (2010). Human colon tissue in organ culture: Preservation of normal and neoplastic characteristics. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **46**:114–122.

Dame MK, Spahlinger DM, DaSilva M, Perone P, Dunstan R, Varani J (2008). Establishment and characteristics of Gottingen minipig skin in organ culture and monolayer cell culture: Relevance to drug safety testing. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **44**:245–252.

Dangles V, Femenia F, Laine V, Berthelmy M, LeRhun D, Poupon MF, Levy D, Schwartz-Cornil I (1997). Two and three-dimensional cell structures govern epidermal growth factor survival function in human bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **57**:3360–3364.

De Ridder L (1997). Autologous confrontation of brain tumor derived spheroids with human dermal spheroids. *Anticancer Res.* **17**:4119–4120.

De Ridder L, Mareel M (1978). Morphology and I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**:189–194.

De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E, Mareel M (2004). Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-β or wounding. *J. Cell Sci.* **117**:4691–4703.

Demayo F, Minoo P, Plopper CG, Schuger L, Shannon J, Torday JS (2002). Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**:L510–517.

Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE (2001). Comparison of three in vitro human "angiogenesis" assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis*. 2001;4(2):113–21.

Dubrot J1, Portero A, Orive G, Hernández RM, Palazón A, Rouzaut A, Perez-Gracia JL, Hervás-Stubbs S, Pedraz JL, Melero I (2010). Delivery of immunostimulatory monoclonal antibodies by encapsulated hybridoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**:1621–1631. .

Dutt K, Harris-Hooker S, Ellerson D, Layne D, Kumar R, Hunt R (2003). Generation of 3D retina-like structures from a human retinal cell line in a NASA bioreactor. *Cell Transplant.* **12**:717–731.

Ebendal T (1976). The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **98**:159–169.

Elvin P, Wong V, Evans CW (1985). A study of the adhesive, locomotory and invasive behaviour of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp. Cell Biol.* **53**:9–18.

Emmert MY, Wolint P, Wickboldt N, Gemayel G, Weber B, Brokopp CE, Boni A, Falk V, Bosman A, Jaconi ME, Hoerstrup SP (2013). Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies. *Biomaterials* **34**(27):6339–6354.

Emura M, Katyal SL, Ochiai A, Hirohashi S, Singh G (1997). *In vitro* reconstitution of human respiratory epithelium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:602–605.

Ermis A, Muller B, Hopf T, Hopf C, Remberger K, Justen HP, Welter C, Hanselmann R (1998). Invasion of human cartilage by cultured multicellular spheroids of rheumatoid synovial cells—a novel *in vitro* model system for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **25**:208–213.

Essen BioScience Inc. *Spheroid measurement on Incucyte* (http://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/8000-0245-A00__-_CellPlayer_3D_Spheroid_Protocol.pdf) .

Fell HB, Robison R (1929). The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.* **23**:767–784.

Folkman J, Haudenschild C (1980). Angiogenesis *in vitro*. *Nature* **288**:551–556.

Franklin RJM, Barnett SC (2000). Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration—the sweet smell of success? *Neuron* **28**:1–4.

Franklin JM, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC (1996). Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory-nerve-ensheathing-cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia* **17**:217–224.

Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2002). Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Adv. Space Bio. Med.* **8**:177–195.

Freshney RI, Hart E, Russell JM (1982). Isolation and purification of cell cultures from human tumours. In Reid E, Cook GMW, MooreDJ (eds.), *Cancer cell organelles; methodological surveys (B): Biochemistry*, Vol. **2**. Chicester, UK: Horwood, pp. 97–110.

Freyer JP, Sutherland RM (1980). Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumour spheroids. *Cancer Res.* **40**:3956–3965.

Fullerton NE, Boyd M, Mairs RJ, Keith WN, Alderwish O, Brown

MM, Livingstone A, Kirk D (2004). Combining a targeted radiotherapy and gene therapy approach for adenocarcinoma of prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **7**:355-63.

Fusenig NE (1994). Epithelial–mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. In Leigh IM, Lane EB, Watt FM (eds.), *Keratinocyte handbook*, Vol. **I**. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, pp. 71–94.

Gobet R, Raghunath M, Altermatt S, Meuli-Simmen C, Benathan M, Dietl A, Meuli M (1997). Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery. *Surgery* **121**:546–661.

Gomez-Lechon MJ, Jover R, Donato T, Ponsoda X, Rodriguez C, Stenzel KG, Klocke R, Paul D, Guillen I, Bort R, Castell JV (1998). Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J. Cell. Physiol.* **177**:553−562.

Gomm JJ, Coope RC, Browne PJ and Coombes RC (1997). Separated human breast epithelial and myoepithelial cells have different growth factor requirements in vitro but can reconstitute normal breast lobuloalveolar structure. *J. Cell. Physiol.* **171**: 11−19.

Green H, Thomas J (1978). Pattern formation by cultured human epidermal cells: Development of curved ridges resembling dermatoglyphs. *Science* **200**:1385–1388.

Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NLC, Hakim M, Song Y, Watsky MA (1999). Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* **286**:2169−2172.

Groves A, Barnett SC, Franklin RJM, Crang AJ, Mayer M, Blakemore W, Nobel M (1993) Repair of demyelinated lesions by transplants of purified 0-2A progenitor cells. *Nature* **362**:453–455.

Gullino PM, Knazek RA (1979). Tissue culture on artificial capillaries. In Jakoby WB, PastanI (eds.), *Methods in enzymology, Vol. 58: Cell culture*. New York: Academic Press, pp. 178–184.

Halleux C, Schneider Y-J (1994). Iron absorption by Caco-2 cells cultivated in serum-free medium as *in vitro* model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cell. Physiol.* **158**:17–28.

Hibino N, Duncan DR, Nalbandian A, Yi T, Qyang Y, Shinoka T, Breuer CK (2012). Evaluation of the use of an induced puripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **143**:696−703.

Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S (2011). 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:1293−1304.

Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H (2013a). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J.* **32**(20):2708−2721. 45232.

Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M, Clevers H (2013b). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* **494**:247−250.

Hume R, Bell J, Cossar D, Giles M, Hallas A, Kelly R (1996). Differential release of prostaglandins by organ cultures of human fetal trachea and lung. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:24−29.

Ichikawa T, Nakazato K, Keller PJ, Kajiura-Kobayashi H, Stelzer EH, Mochizuki A, Nonaka S (2013). Live imaging of whole mouse embryos during gastrulation: Migration analyses of epiblast and mesodermal cells. *PLoS ONE* **8**(7):e64506.

Jackson JP, Tonge PD, Andrews PW (2007). Techniques for neural differentiation of human EC Wiley, pp. 61−91.

Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F (1997). Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. *Nat. Med.* **3**:1203–1208.

Jongpaiboonkit L, King WJ, Lyons GE, Paguirigan AL, Warrick JW, Beebe DJ, Murphy WL. (2008) An adaptable hydrogel array format for 3-dimensional cell culture and analysis. *Biomaterials* **29**:3346−3356.

Keller GM (1995). In-vitro differentiation of embryonic stem-cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:862−869.

Kenworthy P, Dowrick P, Baillie-Johnson H, McCann B, Tsubouchi H, Arakaki N, Daikuhara Y, Warn RM (1992). The presence of scatter factor in patients with metastatic spread to the pleura. *Br. J. Cancer* **66**:243–247.

Klinger RY, Niklason LE (2006). Tissue-engineered blood vessels. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 294−322.

Knazek RA, Gullino P, Kohler PO, Dedrick R (1972). Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth *in vitro*. *Science* **178**:65–67.

Knazek RA, Kohler PO, Gullino PM (1974). Hormone production by cells grown *in vitro* on artificial capillaries. *Exp. Cell Res.* **84**:251.

Knight E, Murray B, Carnachan R, Przyborski S. (2011) Alvetex: Polystyrene caffold technology for routine three dimensional cell culture. *Methods Mol. Biol.* **695**:323−340.

Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA (2014). 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv. Mater.* **26**:3124−3130.

Kondo S, Kooshesh F, Sauder DN (1997). Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *J. Cell Physiol.* **171**:190–195.

Kuslak SL, Marker PC (2007). Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation* **75**:638−651.

Labarge MA, Petersen OW, Bissell MJ (2007). Culturing mammary stem cells. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 282−302.

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**:373−379.

Larsen MC, Brake PB, Pollenz RS, Jefcoate CR (2004). Linked expression of Ah receptor, ARNT, CYP1A1, and CYP1B1 in rat mammary epithelia, *in vitro*, is each substantially elevated by specific extracellular matrix interactions that precede branching morphogenesis. *Toxicol. Sci.* **82**: 46–61.

Lasnitzki I (1992). Organ culture. In FreshneyRI (ed.), *Animal cell culture, a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 213–261.

Lechner JF, LaVeck MA (1985). A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods* **9**:43–48.

Leighton J, Mark R, Rush G (1968). Patterns of three-dimensional growth in collagen coated cellulose sponge: Carcinomas and embryonic tissues. *Cancer Res.* **28**:286–296.

Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998). Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic response to interleukin-1β. *J. Cell Physiol.* **176**:303–313.

Limat A, Breitkreutz D, Thiekötter G, Klein EC, Braathen LR, Hunziker T, Fusenig NE (1995). Formation of a regular neo-epidermis by cultured human outer root sheath cells grafted on nude mice. *Transplantation* **59**:1032–1038.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K, Noser F (1989). Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **92**:758–762.

Linser P, Moscona AA (1980). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina-localization in Muller fibers and dependence on cell interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:6476–6481.

Liu M, Xu J, Souza P, Tanswell B, Tanswell AK, Post M (1995). The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: Comparison of two- and three-dimensional culture systems. *In Vitro Cel.l Dev. Biol. Anim.* **31**:858–866.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2000). Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced KGF expression in resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **114**:1075–1084.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2002). Cell interaction and epithelial differentiation. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 31–63.

Mairs RJ, Wheldon TE (1996). Experimental tumour therapy with targeted radionuclides in multicellular tumour spheroids. In Hagen U, Jung H, Streffer C (eds.), *Radiation research, 1895–1995* (Proc.10th International Congress of Radiation Research, Wurzburg, Germany), Vol. 2. Wurtzburg: Universitatsdruckerei, H. Sturtz AG,. pp. 819−826.

Mareel MM, Bruynell E, Storme G (1980). Attachment of mouse fibrosarcoma cells to precultured fragments of embryonic chick heart. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **34**:85–97.

Mareel M, Kint J, Meyvisch C (1979). Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart *in vitro*. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **30**:95−111.

Markeson D, Pleat JM, Sharpe JR, Harris AL, Seifalian AM, Watt SM (2013). Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med* 9:649–68. (PMID: 24668923).

McCall E, Povey J, Dumonde DC (1981). The culture of vascular endothelial cells on microporous membranes. *Thromb. Res.* **24**:417–431.

Ment LR, Stewart WB, Scaramuzzino D, Madri JA (1997). An *in vitro* three-dimensional coculture model of cerebral microvascular angiogenesis and differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:684–691.

Miyagawa Y, Okita H, Hiroyama M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N (2011) A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Eng. Part A* **17**:13−21.

Mullender M, El Haj AJ, Yang Y, van Duin MA, Burger EH, Klein-Nulend J (2004). Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med. Biol. Eng. Comput.* **42**:14–21.

Mullin JM, Marano CW, Laughlin KV, Nuciglio M, Stevenson BR, Soler AP (1997). Different size limitations for increased transepithelial paracellular solute flux across phorbol ester and tumour necrosis factor treated epithelial cell sheets. *J. Cell Physiol.* **171**:226–233.

Murphy SV, Atala A (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **32**:773−785.

NASA (1997). Bioreactors workshop on regulation of cell and tissue differentiation, proceedings. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:325–405.

Nelson LJ, Walker SW, Hayes PC, Plevris JN (2010). Low-shear modelled microgravity environment maintains morphology and differentiated functionality of primary porcine hepatocyte cultures. *Cells Tissues Organs* **192**(2):125−140.

Neves AA, Medcalf N, Brindle K (2003). Functional assessment of tissue-engineered meniscal cartilage by magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Tissue Eng.* **9**:51−62.

Nicosia RF, Tchao R, Leighton J (1983). Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res.* **43**:2159–2166.

Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanawala A, Sanzgiri S, Langer R (2001). Morphological and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J. Vasc. Surg.* **33**(3): 628–638.

Pelletier L, Regnard J, Fellmann D, Charbord P (2000). An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. *Lab Invest.* **80**:501−511.

Ponce ML (2009). Tube formation: An in vitro matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol. Biol.* **467**:183−188.

Post M, Floros J, Smith BT (1984). Inhibition of lung maturation by monoclonal antibodies against fibroblast-pneumocyte factor. *Nature* **308**:284–286.

Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenburgh HH (2002). Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physio.l* **283**:C1557–C1565.

Quarles JM, Morris NG, Leibovitz A (1980). Carcinoembryonic antigen production by human colorectal adenocarcinoma cells in matrix-perfusion culture. *In Vitro* **16**:113–118.

Ravi M1, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD (2015). 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J. Cell Physiol.* **230**(1):16−26.

Raya-Rivera AM, Esquiliano D, Fierro-Pastrana R, López-Bayghen E, Valencia P, Ordorica-Flores R, Soker S, Yoo JJ, Atala A (2014). Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: A pilot cohort study. *Lancet* **384**(9940):329−336.

Repesh LA (1989). A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. *Invas. Metast.* **9**:192–208.

Rungarunlert S, Klincumhom N, Tharasanit T, Techakumphu M, Pirity MK, Dinnyes A (2013). Slow turning lateral vessel bioreactor improves embryoid body formation and cardiogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Reprogram.* **15**(5):443−458.

Rutzky LP, Tomita JT, Calenoff MA, Kahan BD (1979). Human colon adenocarcinoma cells; III: *In vitro* organoid expression and carcino-embryonic antigen kinetics in hollow fiber culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**:893–902.

Sakai S, Mishima H, Ishii T, Akaogi H, Yoshioka T, Ohyabu Y, Chang F, Ochiai N, Uemura T (2009). Rotating three-dimensional dynamic culture of adult human bone marrow-derived cells for tissue engineering of hyaline cartilage. *J. Orthop. Res.* **27**(4):517−521.

Scanlon CS, Van Tubergen EA, Chen LC, Elahi SF, Kuo S, Feinberg S, Mycek MA, D'Silva NJ (2013). Characterization of squamous cell carcinoma in an organotypic culture via subsurface non-linear optical molecular imaging. *Exp. Biol. Med (Maywood)* **238**(11):1233−1241.

Schlechte W, Brattain M, Boyd D (1990). Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cells: Dependence on urokinase receptor display. *Cancer Commun.* **2**:173–179.

Seidel JO, Peri M, Gray ML, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2004). Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. *Biorheology* **41**:445–458.

Shansky J, Chromiak J, Del Tatto M, Vandenburgh H (1997). A simplified method for tissue engineering skeletal muscle organoids in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:659–661.

Shansky J, Ferland P, McGuire S, Powell C, DelTatto M, Nackman M, Hennessey J, Vandenburgh HH (2006). Tissue engineering human skeletal muscle for clinical applications. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 239−258.

Sorour O, Raafat M, El-Bolkainy N, Mohamad R (1975). Infiltrative potentiality of brain tumors in organ culture. *J. Neurosurg.* **43**:742–749.

Speirs V (2004). Primary culture of human mammary tumor cells. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 205−219.

Speirs V, Ray KP, Freshney RI (1991). Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts. *Br. J. Cancer* **64**:693–699.

Stark H-J, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck M, Pavesio A, Fusenig

NE, Boukamp P (2006). Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J. Invest. Dermatol. Sympos. Proc.* **11**:93–105.

Stark H-J, Willhauck MJ, Mirancea N, Boehnke K, Nord I., Breitkreutz D, Pavesio A, Boukamp P, Fusenig NE (2004). Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalizes epidermal histogenesis and dermo-epidermal junction in organotypic coculture. *Eur. J. Cell Biol.* **83**:631-645.

Stegemann JP, Kaszuba SN, Rowe SL (2007). Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng.* **13**:2601–2613.

Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. 9:649-68. (2006). Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J. Biotechnol.* **122**:372–381.

Sutherland RM (1988). Cell and micro environment interactions in tumour microregions: The multicell spheroid model. *Science* **240**:117–184.

Tasoglu S, Demirci U (2013). Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotechnol.* **31**(1):10–19.

Thelwall PE, Neves AA, Brindle KM (2001). Measurement of bioreactor perfusion using dynamic contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging. *Biotechnol. Bioeng.* **75**:682–690.

Thoma CR, Stroebel S, Rösch N, Calpe B, Krek W, Kelm JM (2013). A high-throughput-compatible 3D microtissue co-culture system for phenotypic RNAi screening applications. *J. Biomol. Screen.* **18**(10):1330–1337.

Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, Healy KE. (2002). Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:1972–1977.

Thomson AA, Foster BA, Cunha GR (1997). Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* **124**:2431–2439.

Tibbitt MW, Anseth KS (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **103**:655–663.

Topman G, Shoham N, Sharabani-Yosef O, Lin FH, Gefen A. (2013). A new technique for studying directional cell migration in a hydrogel-based three-dimensional matrix for tissue engineering model systems. *Micron* (Oxford, UK, 1993), 51.

Totoiu MO, Nistor GI, Lane TE, Keirstead HS (2004). Remyelination, axonal sparing, and locomotor recovery following transplantation of glial-committed progenitor cells into the MHV model of multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* **187**:254–265.

Trapp BD, Honegger P, Richelson E, Webster H de F (1981). Morphological differentiation of mechanically dissociated fetal rat brain in aggregating cell cultures. *Brain Res.* **160**:235–252.

Trowell OA (1959). The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.* **16**:118–147.

Twentyman PR (1980). Response to chemotherapy of EMT6 spheroids as measured by growth delay and cell survival. *Eur. J. Cancer* **42**:297–304.

Van Roozendahl CEP, van Ooijen B, Klijn JGM, Claasen C, Eggermont AMM, Henzen-Logmans SC, Foekens JA (1992). Stromal influences on breast cancer cell growth. *Br. J. Cancer* **65**:77–81.

Vergani L, Grattarola M, Nicolini C (2004). Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1447–1461.

Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D, Eccles SA. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* **10**:29.

Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, Matthews C, Van Obberghen-Schilling E (2004). ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **117**:4559–4569.

Vunjak-Novakovic G (2006). Tissue engineering: Basic considerations. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 132–155.

Waleh NS, Brody MD, Knapp MA, Mendonca HL, Lord EM, Koch CJ, Laderoute KR, Sutherland RM (1995). Mapping of the vascular endothelial growth factor-producing hypoxic cells in multicellular tumour spheroids using a hypoxia-specific marker. *Cancer Res.* **55**:6222–6226.

Walton KD, Kolterud A (2014). Mouse fetal whole intestine culture system for ex vivo manipulation of signaling pathways and three-dimensional live imaging of villus development. *J. Visual Exp* 2014 Sep 4;(91):e51817. doi: 10.3791/51817. (PMID: 25226224).

Ward JP, King JR (1997). Mathematical modelling of avascular tumour growth. *IMA J. Math. App. Med. Biol.* **14**:39–69.

Warmflash A, Sorre B, Etoc F, Siggia ED, Brivanlou AH (2014). A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat. Methods* **11**:847–854. 48.

Wessells NK (1977). *Tissue interactions and development*. Menlo Park, CA: W. A. Benjamin.

Wewetzer K, Verdu E, Angelov DN, Navarro X (2002) Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: Two of a kind? *Cell Tissue Res.* **309**:337–345.

Williams MJ, Clark P (2003). Microscopic analysis of the cellular events during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced epithelial tubulogenesis. *J. Anat.* **203**:483–503.

Wolff ET, Haffen K (1952). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.* **10**:463–472.

Wright KA, Nadire KB, Busto P, Tubo R, McPherson JM, Wentworth BM (1998). Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns* **24**:7–17.

Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, Lubeck E, Shah S, Cai L, Gradinaru V (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* **158**(4):945–958.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I., Richardson A, Weinberg RA (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**:927–39.

Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Prockop DJ (2014). Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy* 2014 Nov;16(11):1486-500. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.07.010. (PMID: 25231893).

Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumour spheroids (MTS). *Cancer Res.* **37**:3639–3643.

Zeltinger J, Holbrook KA (1997). A model system for long-term serum-free suspension organ culture of human fetal tissues: Experiments on digits and skin from multiple body (regions. *Cell Tissue Res.* **290**:51–60.

Zimmermann H, Hillgartner M, Manz B, Feilen P, Brunnenmeier F, Leinfelder U, Weber M, Cramer H, Schneider S, Hendrich C, Volke F, Zimmermann U (2003). Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials* **24**:2083–2096.

（谭玉珍 译）

第21章

规模与自动化

从两个方面可以衡量规模细胞培养活动：①增加细胞产量；②在基于细胞的分析中为检测而增加重复培养的数量。第一个方面是指增加培养物的容量，这种规模的复杂性包括营养供应、气体交换和对于贴壁细胞增加生长表面积。即使在规模培养中这种增加需要质的变化，但操作的数量可能不增加。超过延长的培养周期（数天甚至数周）时，在液体转移区和程序控制区通常需要自动化。第二个方面是指在操作数目方面的数值增加，基于处理的样品数目，重点放在经机器人重复所需操作的自动化上，较少强调程序控制，给予的时间通常较短（数秒或数小时）。本章大部分讨论培养的容量和几何学，最后用较短的节段讨论自动化和机器人学。

规模培养的含义依据实验室不同而有差别。基础研究实验室可能意味着每次培养 1×10^6~1×10^7 个细胞之间的差别，用常规塑料培养皿容易完成，尤其是使用实用性多表面培养瓶如 Falcon Multi-Flask 或 Hyper-Flask（Corning）、Nunc Triple-Flask（Thermo Scientific）、Millicell HY Flask（EMD Millipore）（图 7.6，图 21.9）。1~10L 容积的简单搅拌培养器可获得 1×10^9~1×10^{10} 个细胞，如 Techne 搅拌器和一次性搅拌器（参见 12.5.4 节）。此规模培养涉及使用 Erlenmeyer 培养瓶（e 培养瓶；如 Fernbach 培养瓶，Corning）或 Thomson 培养瓶（HTS Labs）。每瓶容量可达 3L，但需要调控 CO_2 和使用湿润的摇动培养箱。1×10^{10}~1×10^{12} 个细胞的大规模培养需要 10~100L 的设备，如台式或立式实验室规模的发酵器（如 Bellco BCS-36、New Brunswick Celligen、GE Healthcare Wave Bioreactor、Sartorius CultiBag）。为研究应用或工业化实验接种，可将容量从 100L 增加至 1000L。全规模的工业化生产使用 5000~20 000L 生物反应器（参见短篇综述 21.1）。

搅拌器培养和旋转器培养两个词是同义的，趋向用作最低实验室设备条件的简单培养系统。尽管发酵器和生物反应器两个术语不是同义的，但具有相同的含义。发酵器一词来源于微生物培养系统，最初设计为细菌和酵母菌培养，开始用于实验室的设备为 50~100L 容量。但是，随着生物技术工业的发展，在规模上的直线性增加与设计上的多样化密切结合，使其不仅适合于悬浮培养，而且可用于单层培养，由此导致了生物反应器一词的引用。在组织工程方面，生物反应器包括较小容量的构件搅拌培养。

用于增大培养规模的方法取决于这些细胞是在悬浮培养中增殖，还是必须附着于底物上。悬浮细胞培养法一般较为简单，将首先介绍。单层细胞培养技术依赖于增加的可利用生长表面，常较为复杂，将在后面介绍（参见 21.2 节）。许多单层培养技术也适应于悬浮细胞。

21.1 规模悬浮培养

悬浮培养的规模主要首先涉及培养液容量的增加。深度超过 5mm 时需要对培养液进行振荡，以

增加气体交换和防止形成致密沉淀。超过5~10cm（取决于表面积与容量的比率）时需要用CO_2和空气进行充气，以便维持细胞进行适宜的气体交换（图21.1、图21.2）。最好利用一个裹在玻璃摆内的磁铁（Techne 5，Integra），或者用一个有较大表面积的短桨（Bellco）对这些培养物进行缓慢搅拌。搅拌速度应在30~100r/min，足以防止细胞发生沉降。但是，速度不要过快，以免产生损伤细胞的切应力。当血清浓度超过2%，尤其向培养液内充气时，应当加入0.01%~0.1%抗泡沫剂（如EX-CELL、Sigma或FoamAway、Life Technologies）。在无血清培养液中仍需使用其他表面活性剂如Pluronic F68（Sigma），加入可用1%~2%羧甲基纤维素（相对分子质量约10^5），以增加培养液的黏性。建立4L悬浮细胞培养的简单实验室规模的生物反应器在方案21.1中叙述。

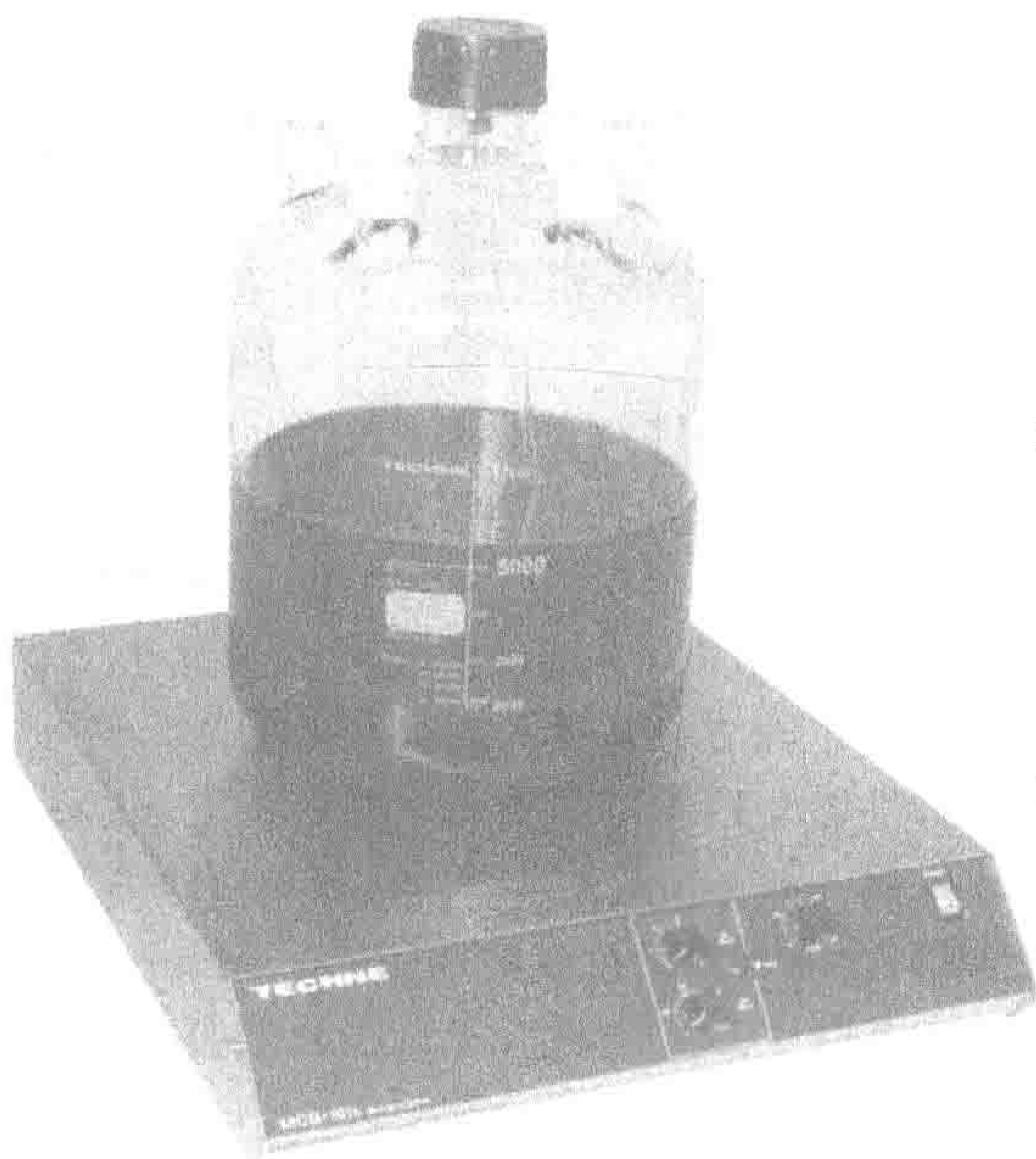


图21.1　大搅拌瓶。磁力搅拌器上的5L大搅拌瓶。注意在瓶底部产生一种环凹式移动的平衡摆。侧臂孔用于取样或灌注培养液所需CO_2的空气（Techne，经Bibby Scientific许可；图21.2）

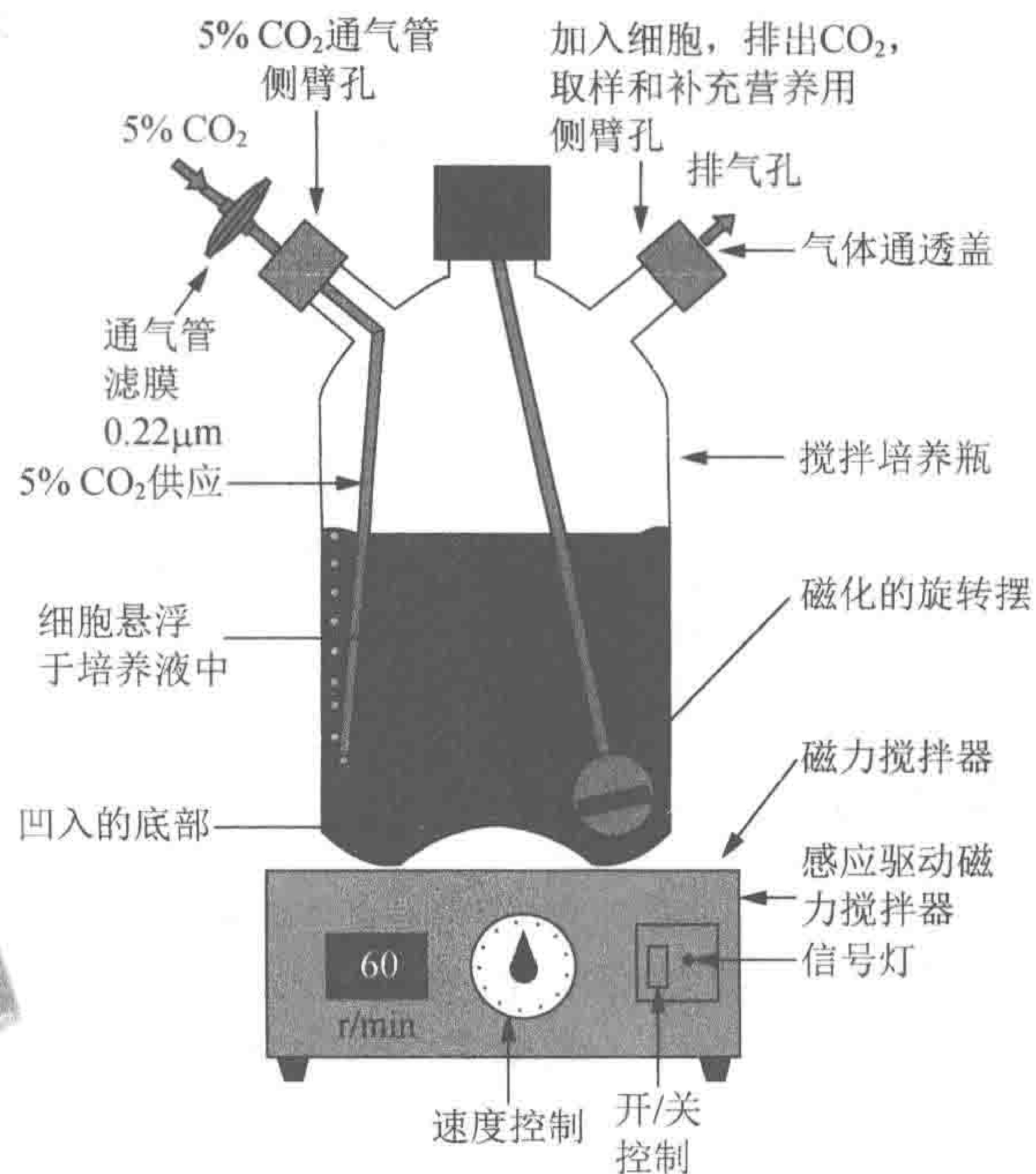


图21.2　大搅拌器培养。适合于8L容量大搅拌瓶的图解

方案21.1　4L分批式搅拌悬浮培养

概要

少量培养后将细胞加入预温的搅拌瓶或生物反应器中，内含用5% CO_2预平衡的培养液（37℃）。利用喷射法缓慢搅拌细胞悬液直至达到所需的细胞浓度，然后收集细胞。

材料

无菌或无菌制备

- 发酵培养瓶（如小搅拌瓶；见图7.7和图12.7，或者适合于细胞自发悬浮生长的静置培养瓶）

- 生长培养基，加热至37℃
- 抗泡沫剂（Pluronic F68，Sigma）
- 安装大搅拌瓶（Bellco，Techne；见图21.1，图21.2）

  （i）裹在玻璃摆内的磁铁或在顶盖悬挂适合于替换的搅拌子（如Techne 5）。

  （ii）一个带有可移动CO_2通透盖（图7.8b）的入口，或者有硅酮横隔的盖，盖上插入一个粗孔针，通过Luer连接管将其固定到无菌的内流式滤器（如Millex，EMD Millipore）上。

  （iii）第2个进入孔，带有内径为2~3mm气流管，这个管几乎到达瓶的底部，但要保持搅拌时不与玻璃摆接触。外部入口与由铝箔保护的柔软Luer管相连。

  （iv）全部安装完毕后，在100kPa（15lb/in^2）压力下，用高压灭菌器将搅拌培养瓶消毒20min，但是，CO_2通气盖要卸下来，分别灭菌。
- 适合连于Luer管的内流式无菌微孔滤膜，直径为25mm，孔径为0.2μm（如Millex），使用时与气体输入管相连。

非无菌

- 磁铁搅拌子（如Bellco，Techne）
- 5% CO_2供应，最好以10~30kPa（2~5lb/in^2）的压力计量供应
- 用于细胞计数的D-PBSA
- 电子细胞计数器或血细胞计数板

操作步骤

1. 用200mL培养液建立初培养（参见方案12.5，图12.7），按5×10^4~1×10^5个/mL的浓度接种细胞。将培养物放在磁力搅拌器上，以60r/min速度搅拌，直至培养细胞浓度达到5×10^5~1×10^6个/mL（*注意：因细胞可发生凋亡，细胞浓度不要超过1×10^6个/mL*）。
2. 如图21.2安装大搅拌瓶或生物反应器。
3. 向瓶内加入4L培养液。
4. 用一次性滴管或注射器向瓶内加入0.4mL抗泡沫剂。
5. 用CO_2通气盖关闭侧臂孔。
6. 将瓶放在磁力搅拌器上，置于37℃暖房或培养箱中。
7. 通过无菌的微孔内流式滤膜，将5% CO_2通气管连到气体入口的Luer管上。
8. 以10~15mL/min的流速开放气体。
9. 以60r/min搅拌培养液。
10. 将大搅拌瓶孵育2h，使温度和CO_2张力达到平衡。
11. 关闭CO_2，将瓶与CO_2管断开。
12. 将大搅拌瓶和初培养细胞一起带回层流通风橱。
13. 将初培养细胞缓慢地一次倒入大搅拌瓶中。
14. 将大搅拌瓶放回37℃培养箱或暖房中。
15. 以60r/min重新开始搅拌。
16. 再连通5% CO_2通气管，将气流调整至10~15mL/min（如果通气管上没有流量表，可通过计数气泡估计流速）。
17. 将细胞孵育4~7天。
18. 每天取样检查细胞增殖率。

    （a）将搅拌瓶带回生物安全柜。

(b)移去侧臂盖。

(c)将样品管的内容物冲掉，然后吸取5~10mL细胞悬液。

(d)将搅拌瓶放回37℃培养箱。

(e)计数细胞，通过染色排斥实验检查细胞的存活能力。

19. 当细胞浓度达到所需水平：

(a)关闭通气管和磁力搅拌器。

(b)中断搅拌瓶的气体供应。

(c)把搅拌瓶带到实验室，将细胞注入离心培养瓶。

(d)离心（100g，10min），按照用途收集细胞（从细胞簇）或上清液。

结果分析 每天检测细胞的生长率。最好的结果是，细胞在培养24h后不应出现迟滞期，而且在收集时仍然呈对数生长。每天绘制细胞增殖曲线，在细胞密度约为1×10^6个/mL时收集细胞。如果超过这个浓度，悬浮培养细胞趋向发生凋亡，除非配制的培养液适合高浓度细胞。

其他说明

添加培养液。向大于5L的瓶内加培养液时，可选择以下操作程序。

(1) 购买能在搅拌瓶一旁挂起的袋装培养液（参见补充材料中的附录Ⅲ），将其加热至37℃，顺其自然地流动。

(2) 将含有预测容量超纯水的搅拌瓶灭菌，在瓶中用浓缩液制备培养液。在瓶的侧壁标出液体平面，以便补充高压灭菌时蒸发的水分。

(3) 使用可高压灭菌的培养液（参见补充材料中的附录Ⅲ），装在瓶中进行高压灭菌（用灭菌超纯水补充蒸发的液体）。

收集细胞。除非底部有出口，从大搅拌瓶抽取液体可能是困难的。底部出口常被死细胞阻塞，应避免此种情况的发生。最好通过下列其中一种方法抽吸或置换收集细胞。

(1) 将内置式滤膜从通气管上移去，加接硅胶管，虹吸出细胞，或用蠕动泵收集细胞。当液体接近瓶底时，将搅拌瓶倾斜。

(2) 卸下5% CO_2通气管，用一条易弯曲的管替换微孔滤膜，将5% CO_2通气管与另一个瓶口相连，经通气管将细胞排出（注意：这时通气管的终端是开放的，即没有滤膜的出口，如图21.2所示）。

可替代培养系统。如同单层培养（参见方案21.3），悬浮细胞也能够通过置于旋转架上的旋转瓶（图21.13）混悬达到规模培养。另外，可购买到各种用于连续培养和分次加入培养液的生物反应器（图21.3、图21.5、图21.6），规格从实验室级（5~50L）至试验工厂级（200~2000L）。许多设备使用单个培养器皿（参见21.1.2节）。

贴壁细胞。除非用微载体培养（参见方案21.4），贴壁依赖性细胞不能在液态悬浮状态下生长，但转化细胞如病毒转化或自发转化的连续细胞系（如CHO和HeLa-S_3）能够生长。由于这些转化细胞仍能贴壁，培养器皿需涂防水硅胶（如Repelcote，VWR），并且可能需降低钙浓度。S-MEM培养基（Life Technologies，Sigma）是一种由不含钙的Eagle's MEM改良而来的，已用于HeLa-S_3和其他细胞的悬浮培养。RPMI1604不含钙、镁，浓度低，可用于类淋巴母细胞的悬浮培养，并适合于其他悬浮生长细胞。

21.1.1 连续和分批培养

如果需要保持细胞的密浓度不变，可在化学恒定器或生物恒定器中维持细胞生长。细胞在这

种培养系统中生长至中对数期（通过每天计数细胞进行检测）。每天取出一定量的细胞，并补充相等容量的培养液。另外，在中对数期以恒定速率使细胞不断流出，并以同样的比率补充培养液。控制装置用于检测 pH、浑浊度、代谢产物产生和其他指标（图 21.19）。后者需要具有 4 个孔的搅拌瓶，其中 2 个孔分别为 CO_2 入口和出口，1 个培养液入口，1 个消耗培养液出口，此出口与收集瓶相连（图 21.3b）。通过细胞的生长率可预测培养液的流速（Griffiths，2000），但最好通过不同流速状态下的连续细胞计数实验确定。生物恒定器的温度可通过将其放入培养箱或含水夹层控制（图 21.3b）。一次性培养袋（Sartorius Cultibag；GE Life Sciences Wave Bioreactor）也可用于连续培养（图 21.3c）。Wave 生物反应器在下面叙述（参见 21.1.3 节）。

在 1~20L 大批量生产细胞，最好按分批式培养法进行（参见方案 21.1）。检测与细胞密度有关的代谢变化需要稳定态培养法，但这种培养法要花费较多的培养液，而且更易导致污染。然而，如果在 50~1000L 培养，那么在细胞生产上将会花费较多的投资和时间。分批式培养法在时间、材料及后续时间方面的花费较大。在某些情况下，最好使用一次性生物反应器进行连续培养。在此，重点叙述分批培养的搅拌罐反应器（STR）操作程序。

21.1.2 一次性生物反应器

再利用生物反应器的购买、准备、组装和运转都很花费，由此引发了对一次性生物反应器（如 Pall Allegro™ STR、Xcellerex XDR-50）的研制。这种生物反应器的无菌部件是塑料的，置于非灭菌的反应器水夹层内面（图 21.5f~h），已证实很有效（Hacker et al.，2009）。有多种 250mL~50L 大小的一次性台式生物反应器，如 Calligen BLU、Millipore Mobius、Sartorius ambr250、Xcellerex XDR-10（图 21.5a~f），大大简化了建立实验室级规模培养的程序。这些生物反应器已验收和灭菌，可连接控制装置、培养液供给端和产品接收器。准备和故障修理时间比再利用生物反应器显著减少，后者需要每次清洗、灭菌和检修。

21.1.3 规模和复杂性

尽管一次性生物反应器更方便，但标准的台式搅拌培养（参见 7.3.5 节和 12.5.5 节）适合于进行约达 10L 大批量细胞和培养液的生产（图 21.5a~d）。然而，如果必须对程序控制付出较多的注意，应使用可控的生物反应器（图 21.3~图 21.5）。这些生物反应器调节培养液和气体的输入，并通过培养瓶中氧、CO_2 和葡萄糖等电极，提供收集资料的可能性。这些成分受可编程的控制单元调节，这个控制单元记录和输出资料，可用于调节气体和液体的输入与输出、搅拌速度和温度等（参见 21.3 节）。

再利用生物反应器和一次性生物反应器的容积可从 15mL 至试验工厂用量，可达 2000L（图 21.6），产品单位可达 20 000L。

21.1.4 搅匀和换气

在悬浮培养中增加规模涉及搅匀和气体交换。与简单的搅拌培养相比，大多数实验室规模的发酵器用旋转的涡轮机或短桨搅动培养液。这些发酵器的设计不同，主要试图以对细胞的最小切应力获得最大的液体运动（图 21.4a）。通常成功的设计是使用缓慢旋转的大叶片式短桨，这种短

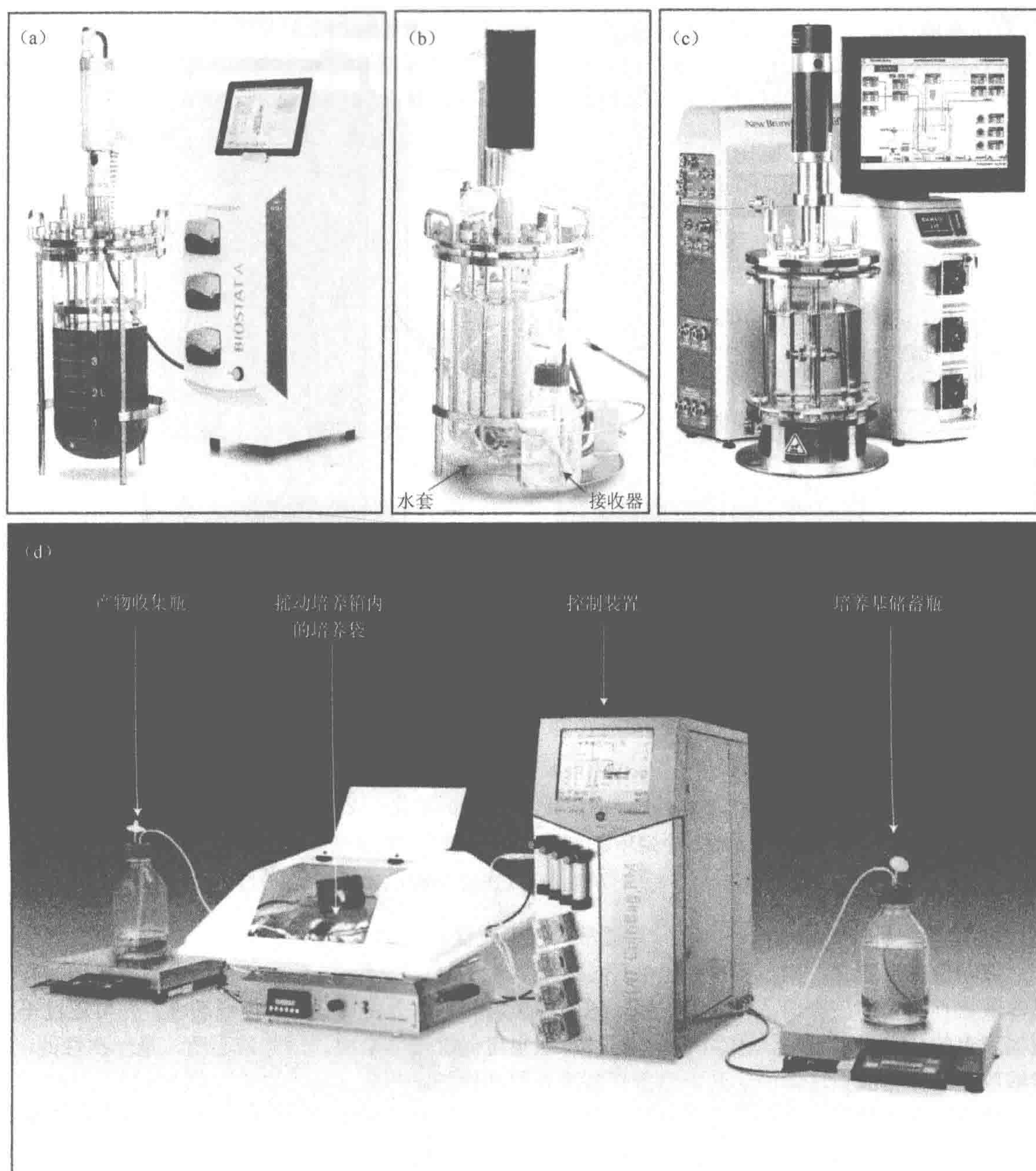


图 21.3 生物恒定器。用于连续培养和分批培养的器皿：(a) Sartorius Stedim Biostat（5L、玻璃的、可再利用，配备 Biostat A 控制显示装置、培养液池、水夹层），未显示产品接收器；(b) 如同 (a) 的装有水套和培养液池的生物恒定器；(c) 新型 Brunswick BioFlow 310（2014 年获得德国 Eppendorf AG 的版权）；(d) Sartorius Stem Biostat CultiBag 波动生物恒定器，用于连续培养或分批培养。(a)、(b)、(c) 引自 Sartorius Stedim

浆具有相对较大的表面积（Griffiths，2000）。添加化学物质是使切应力的有害效应减小到最低限度，如 Pluronic F68（Tharmalingam et al.，2008）或羧甲基纤维素（CMC）（Sen et al.，2002）和聚乙烯吡咯酮（PVP）（Mizrahi and Moore，1970），后两种试剂增加黏度。深层培养需要空气中的 CO_2 喷射。虽然小气泡可促进快速的气体交换，但当暴露在培养液表面时趋向于造成更大的损

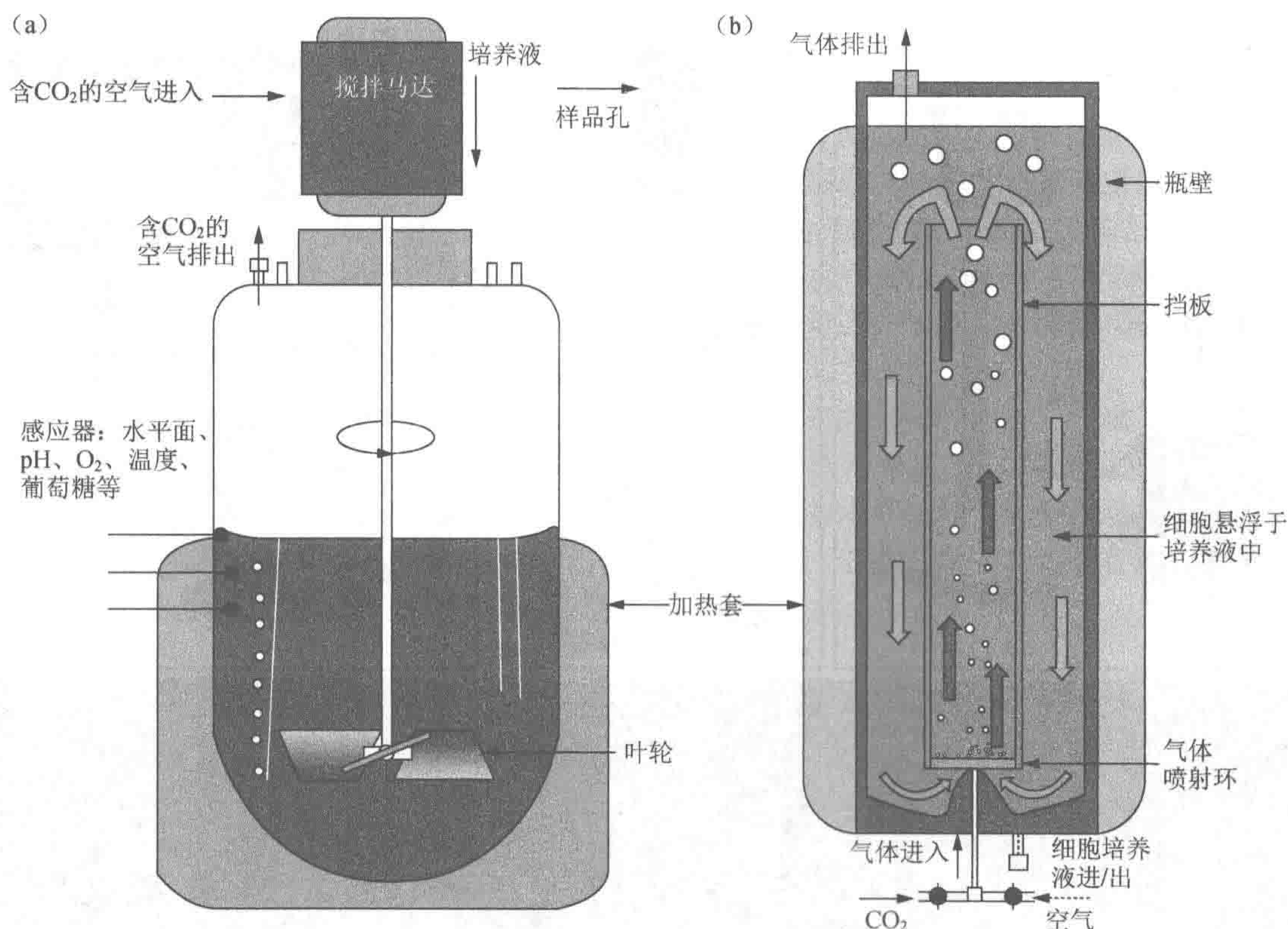


图 21.4 可控生物反应器。（a）搅拌生物反应器，装有划桨、入口和出口、气体喷射和调节传感器。（b）空气上升生物反应器，由两个中心柱组成。内柱的两端比外柱短，由此形成外室和内室。内室的底部带有一个熔结钢环，含有 5% CO_2 的空气通过这个钢环冒出气泡，气泡携带细胞悬液上升。空气/CO_2 从顶部排出，这种替换保证细胞悬液向外室下方再循环（2000 年由 Griffiths 的图改绘而来）

伤（可用 Pluronic F68 减少这种损伤），通常大气泡较佳。

波动生物反应器 培养袋（GE Life Sciences，Sartorius Stedim；见补充材料中的附录III）与培养液储存所用的袋类似，可以用作悬浮细胞规模培养。这些袋具有气体可通透性，并可通过平坦摇床上的托盘进行摇动（图 21.3c）。这种方法也可促进气体交换。培养袋无菌，是一次性的，能够放在培养箱或振荡器中。其单位费用和准备时间较低。

空气上升发酵器 大规模发酵器有时利用空气上升原理（图 21.4b）。含有 5% CO_2 空气被泵入中央圆柱下方的多孔钢环，气泡携带着液流向上流至中央部，在圆柱体顶部释放，而培养液再循环到中央圆柱的底部（如 Bioreactor Sciences）。这种相当简单的发酵器广泛用于生物技术工业（如 Coosen，1991），其容量可达到 20 000L。但目前一般选择分批培养的 STR（M. Butler，个人交流；Varley and Birch，1999；Hacker et al.，2009）。

BelloCell 充气器培养 这个不常用的仪器有一个风箱样培养液室。此室以风箱的“呼吸”运动方式，交替地将培养液挤向附着于有孔性基质上的细胞，然后吸回（图 21.7；Cesco）。若想以最小切应力和很高的密度下达到最理想的混合和充气效果，则需通过将细胞输出量等同于 12 个旋转瓶即可（Ho et al.，2004）。

灌流式悬浮培养 中空纤维和膜灌流系统也可按照分室作用原理操作。细胞以很高密度保留在低容量的分隔室，通过细胞分隔室内的中空纤维灌注培养液（图 21.8，见 7.4.1 节、21.2.5 节）。

尽管该系统是为高密度贴壁细胞设计的，但也可用于非贴壁细胞如杂交瘤细胞。这些细胞形成聚集物，疏松地附在毛细管上，但不紧贴和伸展，有如贴壁的单层细胞那样。气体交换的调节是在培养小室外面进行的。中空纤维是由修饰的聚醚砜（mPES）制成，呈半通透性，按分子量不同限制物质通过纤维壁。中空纤维也可用在双同心管，使培养液灌注入中央管，在外面的管收集产品，细胞种植于两个同心管之间（参见图 20.2）。

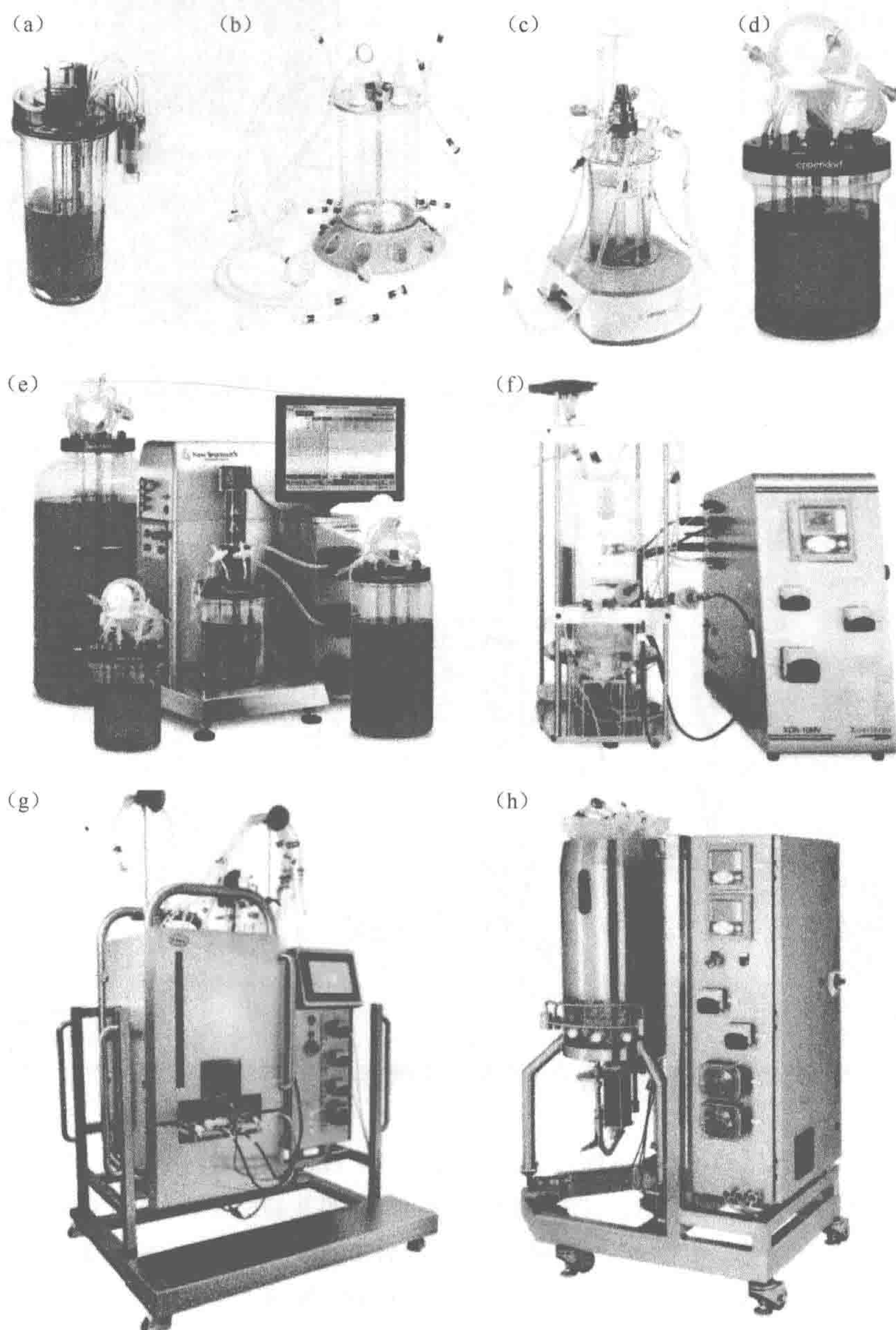


图 21.5 单用生物反应器。各种无菌的一次性生物反应器。(a) ambr250（经 Sartorius Stedium 许可）；(b) Mobius 3L CellReady（经 Merck Millipore 许可），包括较大容量的反应器；(c) UniVessel SU（经 Sartorius 许可），2L；(d) BioBLU 填充床反应器，5L（2014 年获得德国 Eppendorf AG 的版权）；(e) Eppendorf BioBLU Calligen，5~50L（2014 年获得德国 Eppendorf AG 的版权）；(f) Xcellerex XDR-10, 4.5~10L（经 GE Life Sciences 许可）；(g) Allegro™ STR，60~200L（经 Pall Life Sciences 许可）；(h) Xcellerex XDR 50（经 GE Life Sciences 许可）

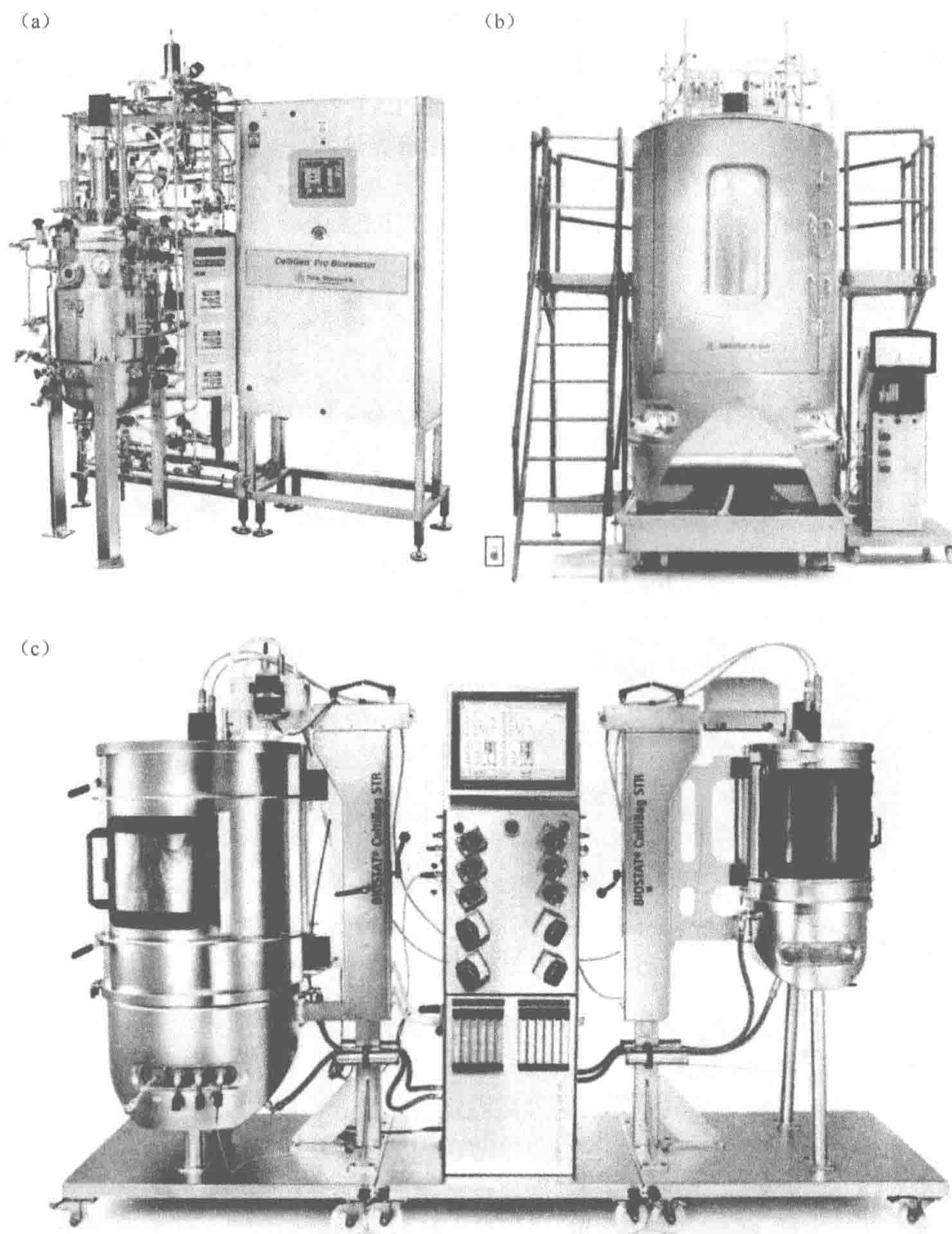


图 21.6 规模生物反应器。（a）Celligen Pro 再利用生物反应器（Eppendorf），可达 75~3000L（2014 年获得德国 Eppendorf AG 的版权）；（b）Biostat STR，2000L，装有一次性生物反应器内胆（Sartorius）（经 Sartorius Stedim 许可），左下角示相同比例的 ambr15（图 21.23b）；（c）Biosat STR 500L（左侧部），带有 50L 初培养装置（Sartorius，右侧部）（经 Sartorius Stedim 许可）

MiniPERM®生物反应器 该反应器也是两室系统，细胞悬液被通透膜（Sarstedt）局限于一个小室，此室与主培养液室隔开。由于细胞不被大部分培养液稀释，Universal Turning Device 的高转速防止细胞聚集，使得细胞呈高密度状态。产品（如杂交瘤细胞产生的抗体）集聚在细胞室内，而营养物质和废物经半通透膜扩散，出入培养液。旋转使培养液混合，培养液可喷洒或替换，而不影响细胞或产品。低转速趋向有利于细胞聚集，以增强细胞分化。

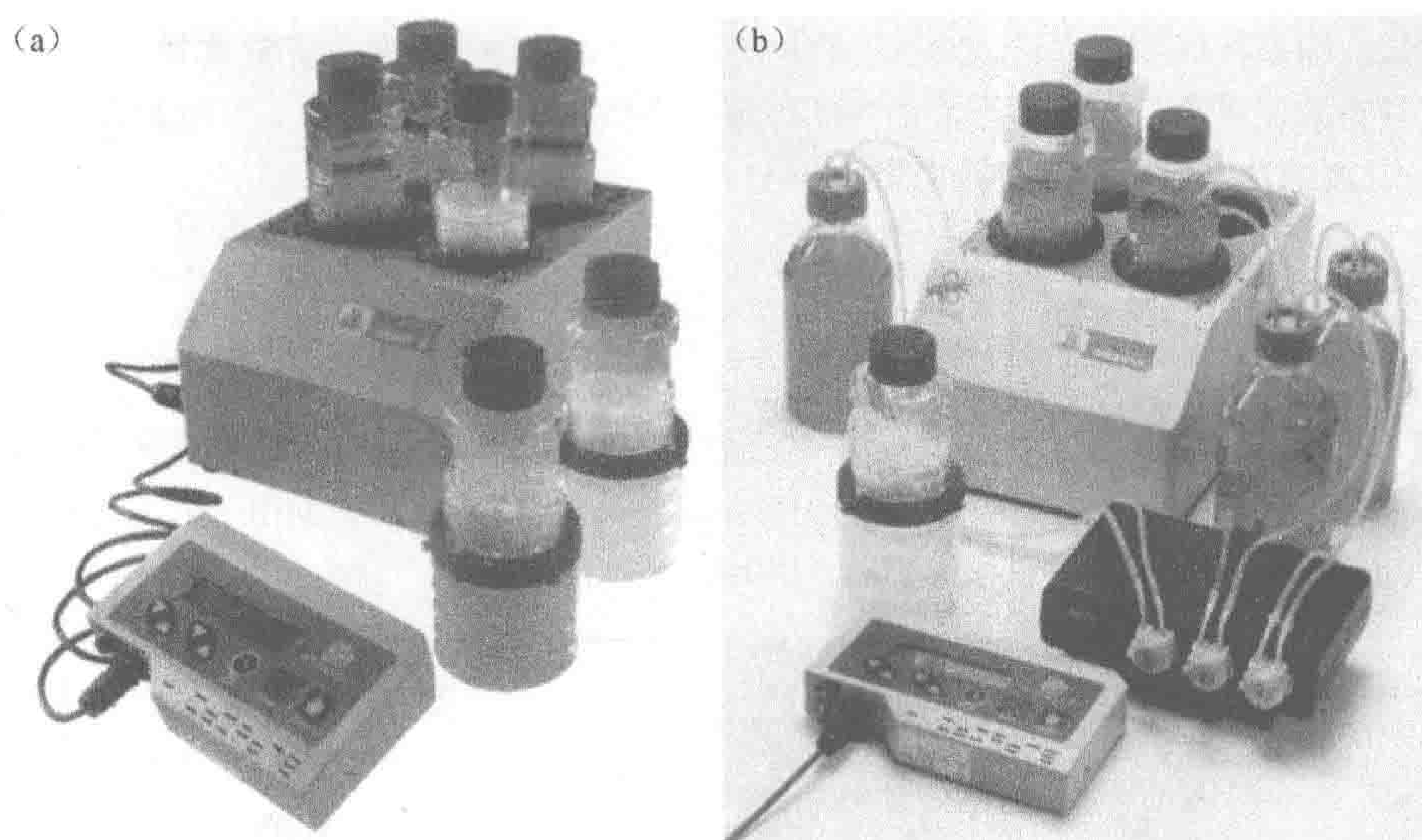


图 21.7　BelloCell 充气式培养。细胞种植在有气孔的载体上，通过下方风箱样小室的泵作用交替地浸没入培养液并进行气体交换。(a) 仪器控制台上的 4 个生物反应器，前面有控制单元。在前面的每个生物反应器显示 BioNOC 载体细胞小室位于中心环和六角形风箱样小室的上方；(b) 为了连续灌流，连接接收器和蠕动泵（参见彩版 22d）（得到 Bellco 的许可）


彩版 22

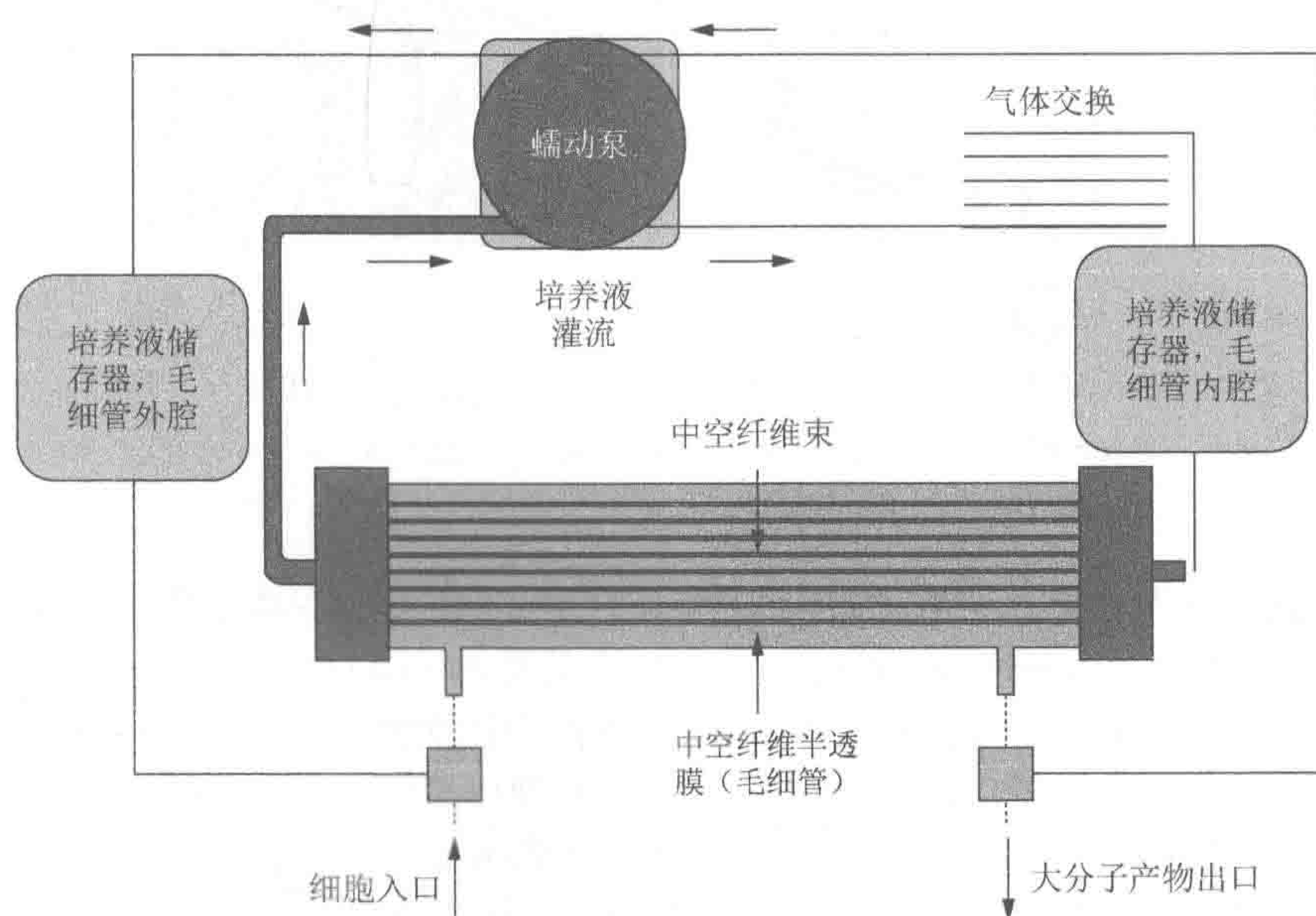


图 21.8　中空纤维灌流培养。中空纤维灌流系统的截面图。培养液借助蠕动泵的作用从培养液储存器循环到培养小室。当该装备放在 CO_2 培养箱内时，充气和 CO_2 交换经气体通透管线圈进行（图 7.11）

21.2　单层规模培养

悬浮生长的细胞容易操作，但具有发生极性潜力的贴壁细胞可作为蛋白质的转录后修饰和适当的膜流动的良好模型，使细胞以生物活性形式释放蛋白质。大多数正常的未转化细胞都以贴壁

单层形式生长，即贴壁依赖性生长。对于这种培养，需要以细胞数量和培养液容量的比率增加底物的表面积，这种需求促进制订了多种不同的实验方案，有些简单，有些复杂。干细胞有着特别的条件需要（参见短篇综述 21.1），以使其扩增而不分化。

21.2.1 多表面扩增器

培养瓶 如本章引言中的叙述，多种多表面培养瓶可用于规模培养的中间阶段，包括 Nunc Triple-Flask（Thermo Life Sciences）、Falcon Multi-Flask（Corning）、Millicell HY Flask（Merck Millipore）（图 7.6）和 Corning Hyper-Flask（Corning；图 21.9）。

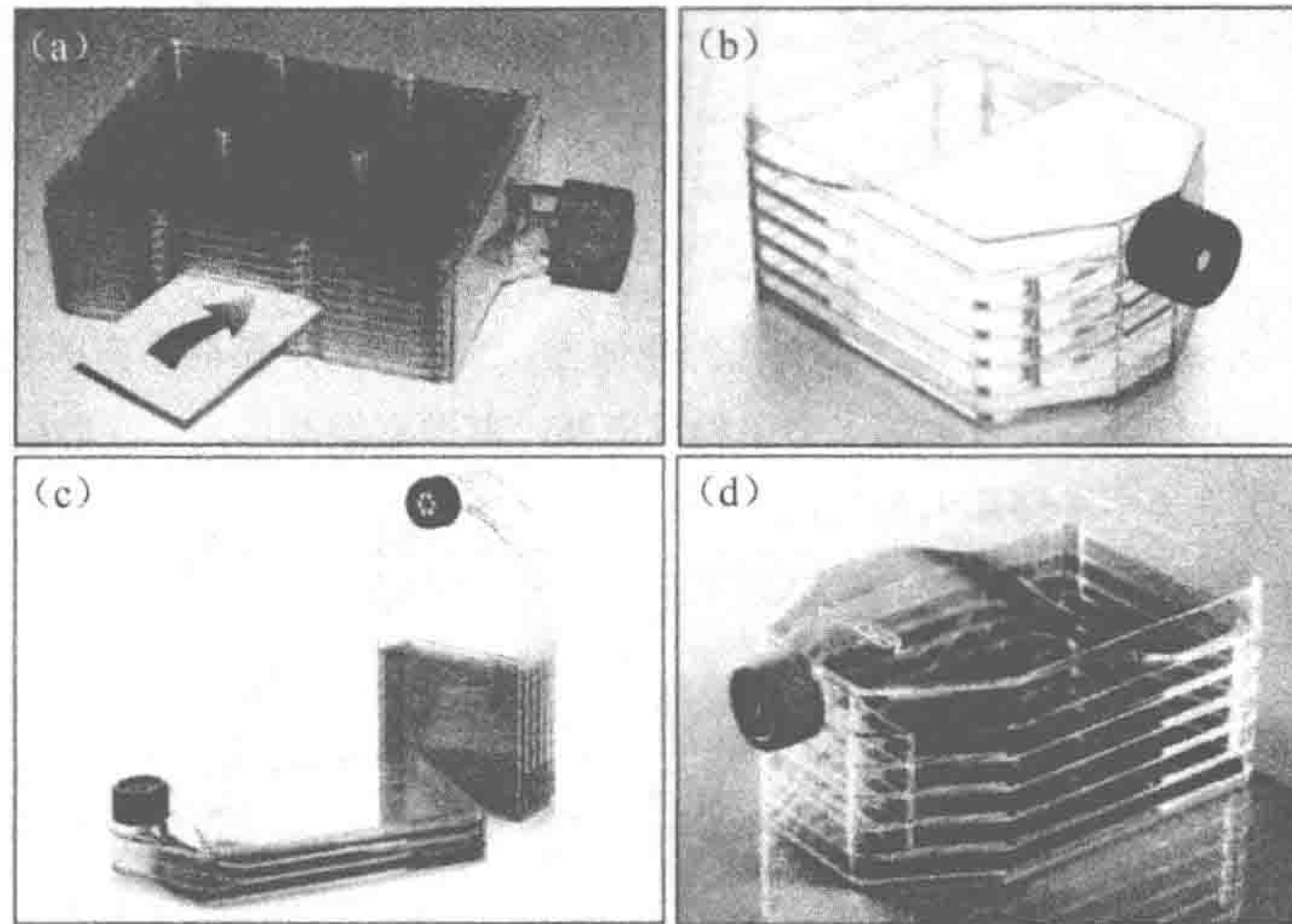


图 21.9 多层培养瓶。(a)Hyper-Flask 是具有 1720cm^2 生长表面积的多表面培养瓶，与 175cm^2 培养瓶(Corning)是同样的产品。箭头示生长表面之间的空气间隙，分隔生长的气体交换在此进行（培养瓶由 Automation Partnership 提供）；(b) Falcon Multi-Flask（经 Corning 许可）；(c) Millicell HY Flask（经 Merck Millipore 许可）；(d) Nest Multi-Flask（经 Wuxi Nest Biotechology 许可）

叠加培养盘 规模单层培养最简单的系统是堆叠复合托盘单位，该单位可达 40 层。最初设计是 Nunc Cell Factory（Thermo Scientific），类似的产品是 Corning Cellstack（Corning；图 21.10，另见表 7.2）。这些系统由长方形的 Petri 培养皿样单元经焊接堆叠而成，总面积为 600~24 000cm^2，通过垂直的管分别在两个相邻角处互相连接。由于垂直管口的位置，只有将单元放在末端时，培养液才能在各小室之间流动。将单元转动并放平时，虽然互相连接的管的开口仍然使气相连续，但每个小室中的液体是独立的。这些生物反应器具有在几何形状和底物的性质方面与常规培养瓶或 Petri 培养皿没有差异的优点。

由于培养空间与含气空间交错（如同 Hyper-Flask），培养液和细胞空间不需要在上方留有含气空间，HyperStack 细胞培养器皿（Corning）在一定容量条件下产出细胞较多。较密集的培养器皿产量则较大。可选用 12 层、36 层、120 层培养盘，其培养面积为 6000cm^2、18 000cm^2、60 000cm^2，可以产出 1.2×10^{10} 个 HeLa 细胞。

Cell Factory 的推荐方法将在方案 21.2 叙述（图 21.11）。用 CellStack 的使用操作与其是类似的。

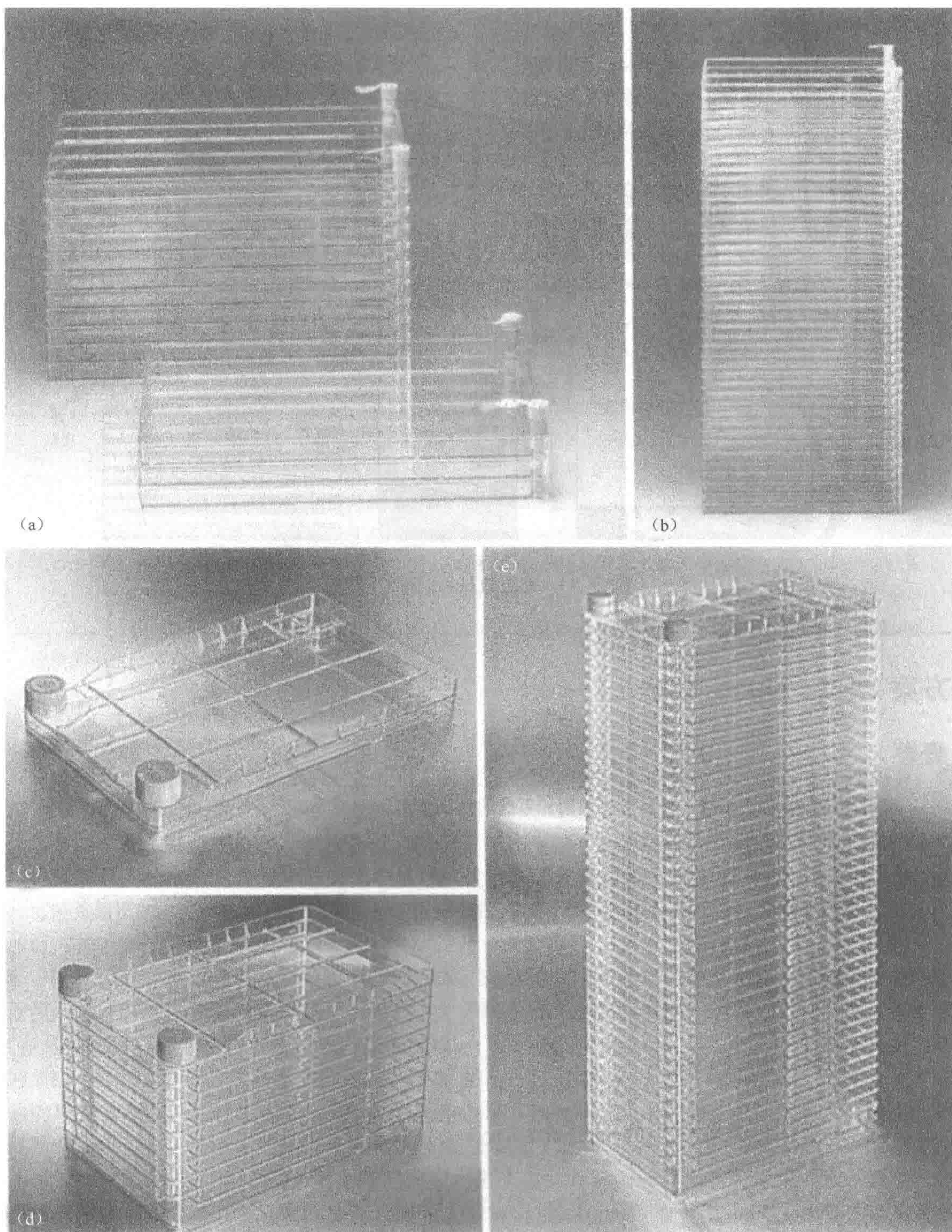


图21.10 多表面扩增器。(a)(b)Nunc Cell Factory，叠加的培养盘，每个盘632cm^2。(a)两室(1264cm^2)和10室(6320cm^2)细胞工厂；(b)40室细胞工厂，25 280cm^2(经Nunc-Thermo Scientific许可)；(c)~(e)Corning Cellstack。(c)单室，632cm^2；(d)10室，6360cm^2；(e)40室，254 440cm^2(经Corning Life Sciences许可)

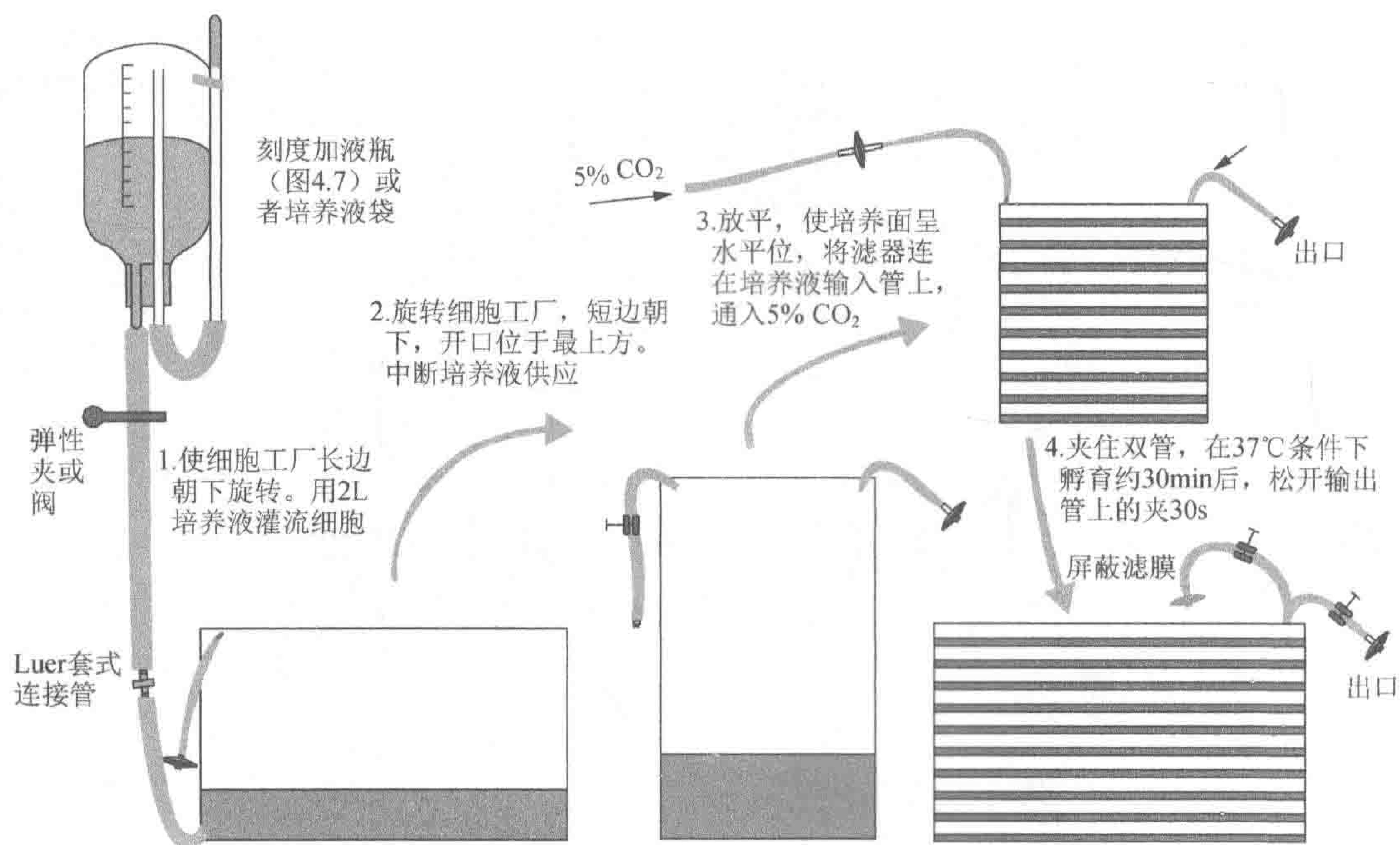


图 21.11　充盈的 Nunc 细胞工厂

方案 21.2　Nunc 细胞工厂

概要

用培养液制备细胞悬液，使悬液流入培养系统的各小室内。使长边朝下，放置（图 21.11）。将培养系统旋转 90°，放平后用 CO_2 充气，然后封闭，进行培养。

材料

无菌

- 单层细胞
- 生长培养液
- 0.25%粗制胰蛋白酶
- D-PBSA
- 10 室 Nunc 细胞工厂（Thermo Life Sciences）
- 硅酮管和连接器

非无菌

- 血细胞计数板或电子细胞计数器和计数用液体

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化（参见方案 12.3）后，将细胞悬浮，计数细胞（参见方案 23.1 和方案 23.2），用

2L 培养液将悬液稀释至细胞密度为 2×10^4 个/mL。

2. 使小室长边朝下放置，将培养液供应管与 Luer 连接管相接，再通过供应管与底孔连通（图 21.11）。
3. 经供应管加入细胞和培养液。所有培养小室内的液体会达到相同水平。
4. 按单层细胞平面将小室转动 90°，使培养系统的短边朝下放置，使进孔和供应管在上。
5. 在 Luer 连接管处，中断供应管与培养液储存器的连接。
6. 与细胞单层平面垂直，将培养小室转动 90°，以底部放平，使培养面呈水平位。
7. 用 5% CO_2 空气向培养系统充气 5min，然后夹住供应管和出口。如果需要，可连续充气。
8. 倒掉供应管和出口内的培养液，然后将单元移入培养箱。
9. 更换培养液（或收集培养液）时，按步骤 6 的相反程序操作。除去输入管上的滤器，然后按步骤 4 相反程序操作。
10. 擦洗 Luer 连接管，松开夹具，使培养液流出。
11. 按步骤 2~8 更换培养液。
12. 收集细胞。
    (a) 按步骤 9 和步骤 10 移去培养液。
    (b) 加入 500mL D-PBSA，然后移去。
    (c) 加入 4℃的 500mL 胰蛋白酶，30s 后移去。
    (d) 用剩余的胰蛋白酶将细胞消化 15min。
    (e) 加入 500mL 培养液，使其均匀地分布。然后，摇动培养小室，使细胞悬浮。
    (f) 按步骤 9 和步骤 10 取出含细胞的培养液。
13. 残留细胞可用于接种下一批细胞，虽然这种方法难以控制接种密度。最好是将培养小室丢弃，用新的小室重新培养。

结果分析

观测。观测细胞在这些培养小室内的生长状态是困难的，因此用一个盘作为实验性培养。假设这个盘的细胞行为能代表多室系统。

产品收集。可反复收集上清培养液，用于病毒或细胞产物的纯化。收集细胞以供分析依靠胰蛋白酶消化的效率。这种技术具有简单易行的优点，但如果在每次收集细胞后将整个培养系统丢弃可能是昂贵的。这种技术最初是为收集上清培养液而设计的，但也是生产大量细胞（1×10^8~1×10^{10}）的好方法。

多列阵培养皿、螺旋柱和培养管。培养皿、螺旋柱和培养管都已用于增加单层细胞生长的表面积，但目前这些多阵列系统几乎买不到。大多数基质或多表面增殖器的培养目前趋向于灌流法（参见 21.2.5 节），这种方法注重产品的回收。CellCube（Corning）是一种多表面灌流系统（图 21.12），中空的聚苯乙烯立方体的内部具有复合的多层（细胞生长面积为 8500cm²），用充氧和预热的培养液灌流。运行 CellCube 的仪器是 E-Cube（Corning）。内部的板层能为单层细胞生长提供两个表面，但生长不可能是完全随机的（Aunis et al.，2003）。现在可购买到 miniPERM 摇动培养器皿（参见 21.1.4 节），用于黏附细胞的固定基质面积为 240cm²。Xpansion 培养板系统由一次性的一组聚苯乙烯培养板（细胞生长表面为 612cm²）、检测 pH 和溶解氧（DO）的一次性探头和用于形态学观察的全像摄影显微镜构成。

21.2.2 旋转培养

如果将细胞接种到圆形瓶或圆形管内，使这些瓶或管在旋转架（图 21.13）上沿其长轴旋转，

携带细胞的培养液则沿瓶的内面流动。如果细胞是非贴壁的，旋转运动将搅动细胞使其悬浮在培养液中。如果细胞是贴壁的，这些细胞将逐渐附着于培养瓶的内表面，然后生长形成单层（图 21.14）。

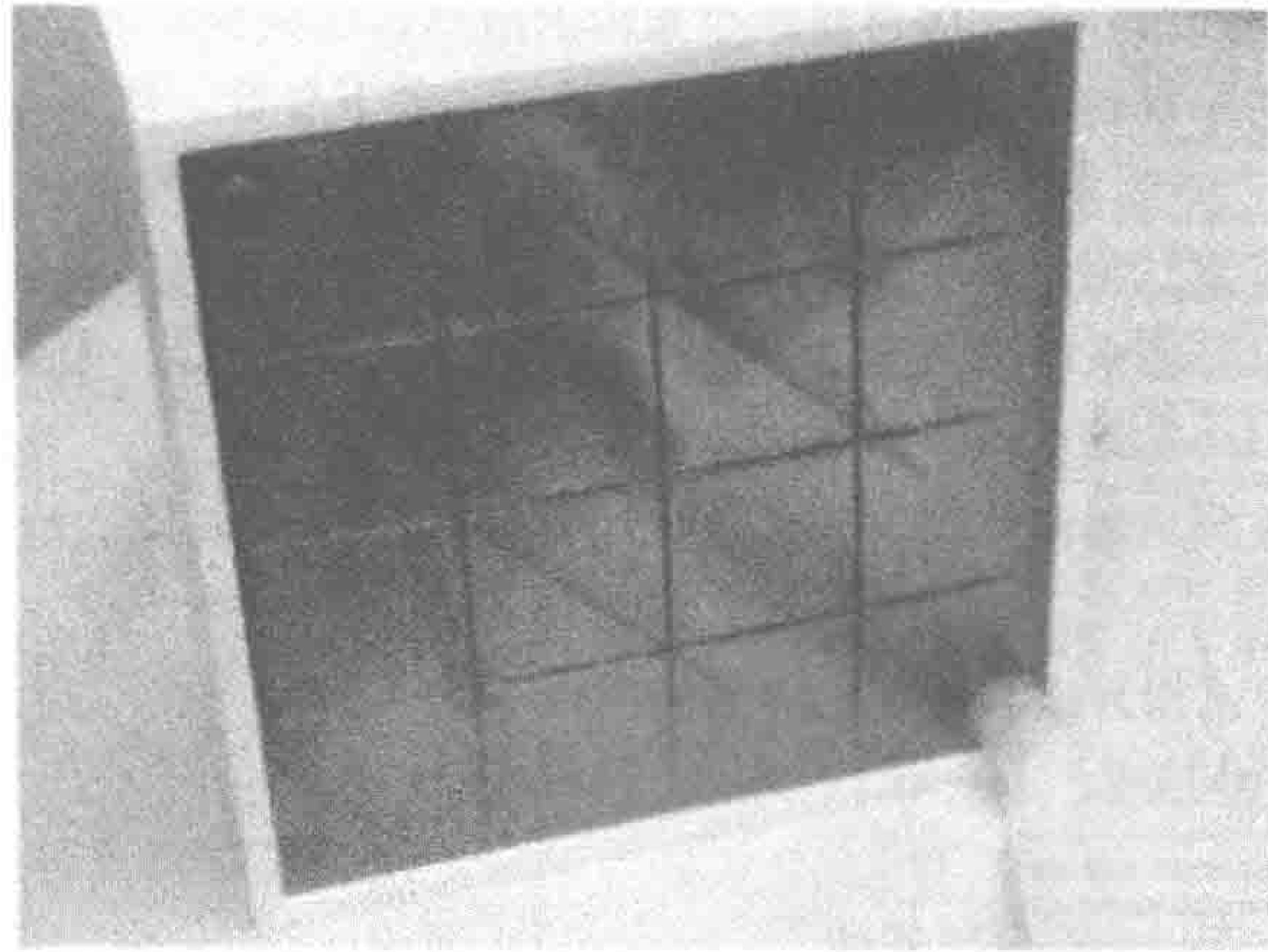


图 21.12　Corning CellCube。有 $6500cm^2$ 可利用生长面积的多表面细胞增殖器（经 ATCC 许可）

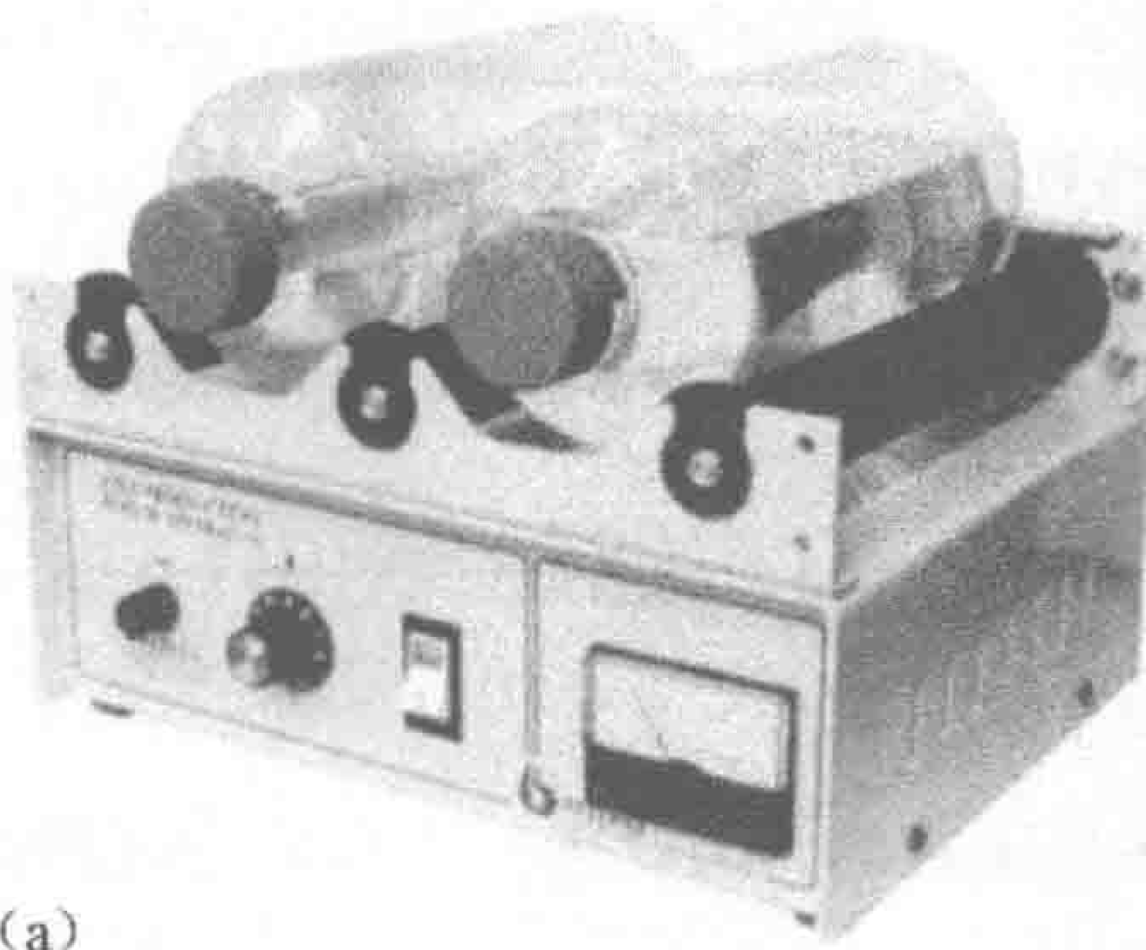




图 21.13　放在支架上的旋转培养瓶。（a）CellRoll 小台式旋转架（经 Integra 许可）；（b）大的自由放置的可伸展旋转架（Bellco；经 Beatson Institute 许可）

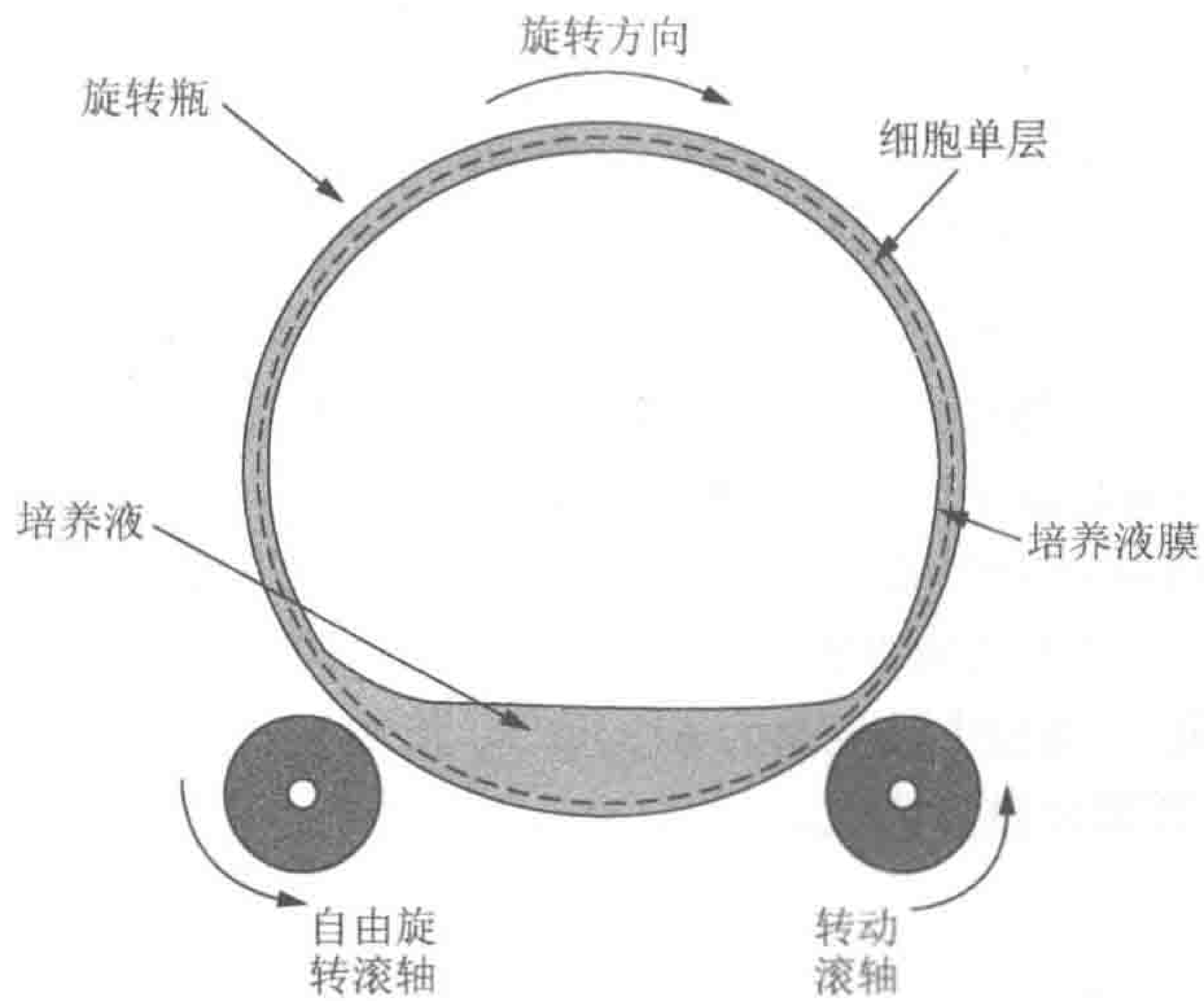


图 21.14　旋转瓶培养（方案 21.3）。细胞单层（虚线）在液体中恒定地孵育，但液体浸没仅约周长的 1/4，这保证培养液的不时更换和气体交换的迅速进行

这个系统主要有3个方面优于静止的单层培养：①增加培养瓶的可利用表面积；②恒定且轻度地搅动培养液；③增加培养液的表面积与其容积的比率，这使气体交换通过细胞表面的薄层培养液进行，从而增加气体交换的效率。实际上细胞未浸入培养液的深部。然而，旋转培养需要安装旋转架，比相同表面积和产量的Cell Factory或Cellstack需要更多的空间。

方案21.3 旋转瓶培养

概要

将细胞悬液加入到圆形培养瓶中，然后将培养瓶放在旋转架上缓慢转动。

材料

无菌或无菌制备

- 培养液和培养液容器
- D-PBSA
- 0.25%粗制胰蛋白酶
- 初培养单层细胞
- 旋转培养瓶

非无菌

- 血细胞计数板或电子细胞计数器和计数用液体（参见方案23.1和方案21.2）
- 5% CO_2供应
- 旋转架（图21.13）

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化细胞，然后以通常密度种植。

注意事项 旋转瓶中的气相较大，故用基于Hanks盐和空气气相的培养基（参见表8.1），可能需要向培养瓶内充入少量5% CO_2（如10L/min，2s）。如果培养液是用CO_2/HCO_3缓冲的，气相应该用5% CO_2调整（20L/min，30s~1min，以瓶的大小决定；见方案12.3节）。

2. 将培养瓶放在旋转架上，以20r/min的速度转动，直至细胞贴壁（24~48h）。
3. 细胞密度增大时，加快旋转速度至60~80r/min。
4. 给细胞加培养液或收集培养液时，可将培养瓶取到无菌工作区，如通常那样排出培养液，然后更换新鲜培养液（参见方案12.1）。假如体积不是关键问题，输血装置（图4.4）或培养液袋对于添加新鲜培养液是有用的。如果培养液容量至关重要，可用吸管滴加或用一个蠕动泵计量（参见4.2.3节）。
5. 收获细胞。
   (a) 弃去培养液，用50~100mL D-PBSA浸洗细胞，然后弃去D-PBSA。
   (b) 在4℃条件下，加入50~100mL胰蛋白酶。用手或放在旋转架上以20r/min将培养瓶转动15s。
   (c) 吸出胰蛋白酶，将培养瓶内的细胞消化15min，然后加入培养液。
   (d) 摇晃和转动培养瓶，用滴管将细胞洗出。

结果分析 对旋转瓶中的细胞进行观测是困难的，但通常可在倒置显微镜下观察细胞。然而，有些显微镜需要除去聚光镜。对于另一些显微镜，培养瓶不适合于放在载物台上。因此，应选择一台有足够载物台的显微镜。

对于反复收获大量细胞或收集上清培养液，旋转瓶系统或许是最经济的，尽管劳动强度大且旋转架的花费大（图 21.13）。

其他说明

细胞聚集。有些细胞在贴壁之前趋向于聚集。这种现象难以克服，但通过将起始旋转速度降低至 5r/min 甚至 2r/min、试用不同类型或批号的血清或者用纤连蛋白或多聚赖氨酸预涂旋转瓶内表面，可减轻细胞聚集（参见 7.2.1 节）。

培养瓶大小。培养瓶的大小为 500~1800cm^2，一次性的和重复利用的都可购买到（参见表 7.2；补充材料中的附录III，旋转瓶）。有的培养瓶提供一种棱条状的内表面，以增加适合于细胞生长的表面积（Corning）。

培养液容量。培养液的容量可以变化。低容量能使气体交换较好地进行，更适合于非转化细胞。转化细胞较为厌氧、生长较快、产生较多的乳酸，更适合在较大容量的培养液中培养。表 7.1 列出的容量是平均值，可适当减半或加倍。

生物力学。对于培养瓶，旋转架更为可取（图 21.13b），因为旋转架在空间上比较经济，易于对培养瓶进行观察。另一方面，旋转鼓（图 21.15）比一定容量的培养瓶需要较大的空间，但对于大量小培养瓶或培养管是有用的。小培养瓶或培养管装入一个圆柱形的容器内，也可在旋转架上转动。

一次性产品。除常规一次性旋转瓶外，可购买预消毒的 20 瓶包装的产品，这相当于 200 个标准旋转瓶，单用和一次性使用。作为已被验证的灭菌包装，与蠕动泵上的培养液供应管相连，并插入驱动系统的鼓内，该鼓转动使培养液进入 CO_2 培养箱或标准培养箱，可人工操作或自动化控制［RollerCell 40（图 21.16），Cellon］。

21.2.3 微载体

单层细胞可在直径为 90~300μm 的用塑料、玻璃、明胶或胶原蛋白制成的微珠上生长（Griffiths，2000）（表 21.1）。通常有一个中央的核心，可以是聚乙烯、纤维素或 dextran，表面涂有玻璃、组织培养处理的聚乙烯、明胶或纤连蛋白。表面电荷通常是阳离子，但可以不同。微珠通常是球形的，有些是有孔的，以便于细胞除在微珠表面上生长（如 Cytoline、Cytopore 和 Cultispher）（图 21.17）外，还能在微珠内的空隙生长。在微珠上培养单层细胞可以提供最大的培养表面积与培养液容量比率，可达 90 000cm^2/L，这取决于微珠的大小和密度。这种培养还有其他优点，即可如同悬浮培养一样处理细胞。虽然 Nunc 细胞工厂利用常规的几何形状增加培养规模（参见 21.2.1 节），但微载体在底物设计方面需要有显著的变化。然而，这种差别在显微镜水平上的作用很小（彩版 18c），因为细胞仍生长在固体与液体界面的平滑表面上，虽然有些细胞受曲率半径的影响可能适于较大微珠直径或平面（彩版 18d）。


彩版 18

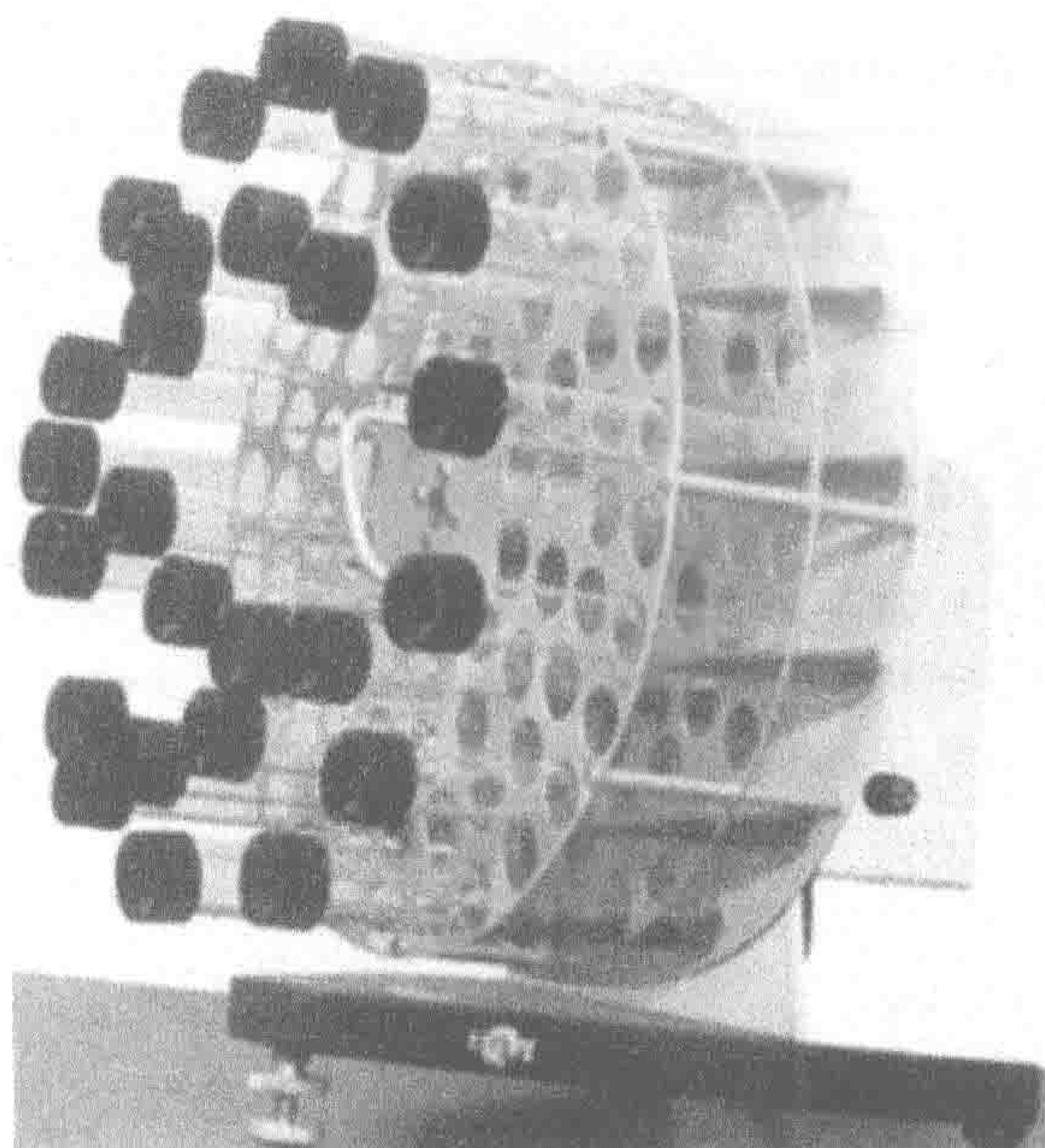


图 21.15 旋转鼓装置。New Brunswick Scientific 生产的 TC-7 旋转鼓。旋转鼓用于大量小培养瓶或培养管的旋转培养（George Gey 提供的原始想法；经 New New Brunswick Scientific 许可）

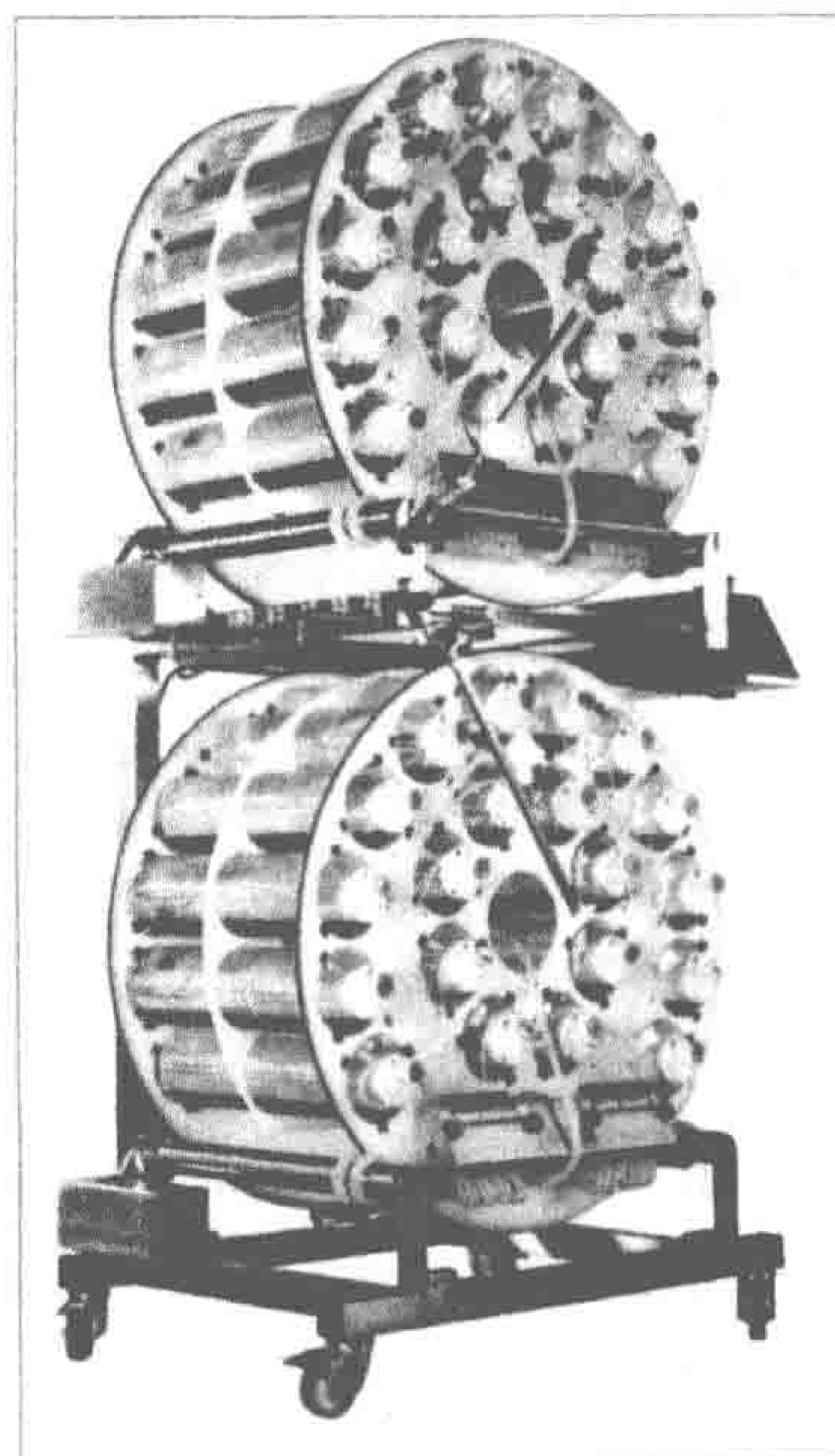


图 21.16 RollerCell 40。每个单用转鼓装有许多无菌瓶和用于加培养液和通气的连管（经 Cellon SA，Lucxembourg 许可。Synthecon 是在美国的代理商）

微载体系统的主要区别在于操作处理的机制（Griffiths，2000）。在不使微珠摩擦的情况下，有效搅拌是基本的。如悬浮细胞培养，用悬浮的旋转磁铁（Techne；见图 7.7、图 21.1 和图 21.2）或短桨（Bellco）以 30r/min 搅拌，可达到有效搅拌。人们对于将干细胞种植在微载体上以便扩增用于组织工程有着很大兴趣。但问题是最大限度地降低旋转速度，以减少切应力，使细胞保留在微载体上（Ismadi et al.，2014；Parmar et al.，2015；Badenes et al.，2015）。

技术性资料可从微载体供应商获得，以帮助建立令人满意的细胞培养。有人已发表许多有关微载体培养的方案（如 Griffiths，2000；Butler，2004）（参见方案 21.4）。

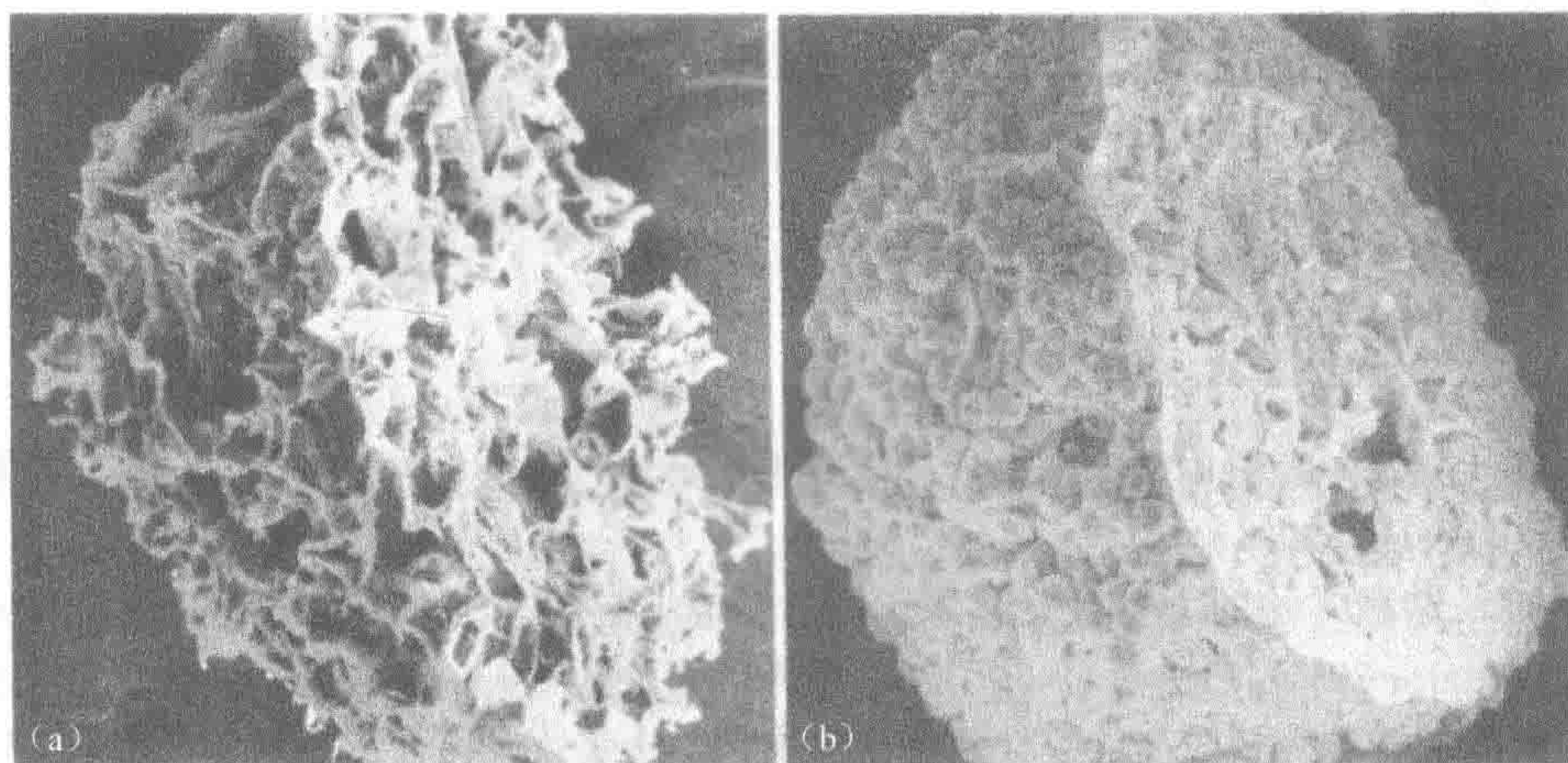


图 21.17 Cytopore 微载体。多孔微载体的扫描电镜图像。（a）单纯的微珠；（b）覆盖 CHO 细胞的微珠（经 New GEHealthcare 许可）

方案 21.4 微载体

概要

以高浓度接种细胞和微珠，然后按照要求进行稀释、搅拌和取样。

材料

无菌

- 生长培养基
- 微载体（参见表 21.1 和补充材料中的附录III）
- 初培养细胞
- 搅拌培养瓶（参见图 7.7、图 21.1 和图 21.2，见补充材料中的附录III）

非无菌

- 磁力搅拌器（Techne，Bellco）

操作步骤

1. 按照所需最终培养液量的 1/3，以 2~3g/L 混悬微珠。
2. 用胰蛋白酶消化和计数细胞。
3. 以正常接种浓度的 3~5 倍将细胞接种到微珠悬液中。
4. 以 10~25r/min 将培养物搅拌 8h。
5. 加入培养液，达到 0.7~1g/L 的微珠浓度的最终容量。
6. 增快搅拌速度至 60r/min。
7. 如果 pH 下降，关闭搅拌器后培养 5min，使微珠沉降下来，然后更换 1/2~2/3 的培养液。
8. 收集细胞。
   (a) 吸出培养液。
   (b) 通过沉降法清洗细胞。
   (c) 用胰蛋白酶/EDTA 处理微珠。
   (d) 让微珠沉降。
   (e) 通过转动使细胞从微珠脱落下来。
   (f) 通过混悬和离心清洗细胞。

结果分析 胰蛋白酶消化微珠样本后计数细胞。另外，可进行微珠样本的 MTT 检测（参见方案 24.4）（Liu et al.，2004）。

其他说明 这种方法的大多数变化源于微珠的选择或培养瓶和搅拌器的设计（Griffiths，2000；Martin et al.，2011；Park et al.，2013）。微珠的密度为 1.03~1.05g/cm^2，影响搅拌速度，这是因为较高密度的微珠需要较高的搅拌速度。微珠的成分或包被也会影响细胞的附着，较难培养的细胞可能用明胶微珠或胶原蛋白微珠培养较好。用蛋白酶消化时，这些微珠是可溶的。有些微珠用重组纤连蛋白包被（Pronectin，Sigma-Aldrich）（表 21.1）。玻璃微珠最容易重复利用。

表 21.1　微载体和巨载体

名称	供应商	特点	比重	直径（μm）
Corning collagen-coated	Corning	包被胶原蛋白	1.026	125~212
Corning Enhanced Attachment	Corning	聚苯乙烯	1.026	125~212
Corning positive charge	Corning	正电荷的聚苯乙烯	1.09	160~200
Corning Synthemax II	Corning	聚苯乙烯，包被合成物，用于干细胞培养	1.026	125~212
Cytodex 1	GE Healthcare	二乙基氨基-右旋糖酐	1.03	60~87
Cytodex 3	GE Healthcare	包被明胶的右旋糖酐	1.04	175
Cytoline 1	GE Healthcare	高密度、聚乙烯/硅酸盐 大孔的	1.32	（500~1000）×（1700~2500）
Cytopore 1	GE Healthcare	二乙基氨基-纤维素（低电荷密度）大孔的	1.03	230
Cytopore 2	GE Healthcare	二乙基氨基-纤维素（高电荷密度）大孔的	1.03	230
FibraCel	New Brunswick-Eppendorf	处理过的聚酯/聚丙烯		直径为 6000 的圆盘
HyClone Cultispher-G	GE Healthcare	明胶，大孔的	N/A	130~380
HyClone Cultispher-GL	GE Healthcare	明胶，大孔的	N/A	150×330
HyClone Cultispher-S	Sigma	明胶，大孔的	1.02，1.04	130~380
HyQSphere	Nordic Biolabs	交联的聚苯乙烯，非包被，负电荷，或包被纤连蛋白、胶原蛋白，或 ProNectin 包被	1.02~1.12	90~212
Rapidcell C	MP Biomedicals	包被胶原蛋白	1.02	90~150
Rapidcell G	MP Biomedicals	玻璃	1.03	150~210
Rapidcell P	MP Biomedicals	聚乙烯	1.02，1.03	150~210
SoloHill Collagen	Pall	包被胶原蛋白	1.02	125~212
SoloHill FACTIII	Pall	明胶/聚苯乙烯	1.02，1.04	90~212
SoloHill Glass	Pall	玻璃包被的聚苯乙烯	1.02，1.04	90~150，125~212
SoloHill Hillex II	Pall	修饰的聚苯乙烯，负电荷	1.11	160~180
SoloHill ProNectin	Pall	包被重组纤连蛋白	1.02	125~212

21.2.4　巨型微载体

有一些较大的多孔性微载体，有时称为巨载体（macrocarrier），其大小从 1mm×2mm（GE Healthcare Cytoline）至 6mm 直径圆盘（New Brunswick FibraCell）不等。其显微结构是由许多不同的物质以不同的几何形状构成（图 20.11），如处理过的聚酯/polypropylene、聚乳酸（PLA）、聚乙醇酸（PGA）、胶原蛋白或明胶（Gelfoam，Pfizer）。巨载体能够承载细胞、在生物反应器内搅拌或在固定床反应器内灌注（参见 21.2.5 节，图 21.7、图 21.17 和图 21.18），用该系统培养杂交瘤细胞效果很好（George Lovrecz 的个人交流资料）。

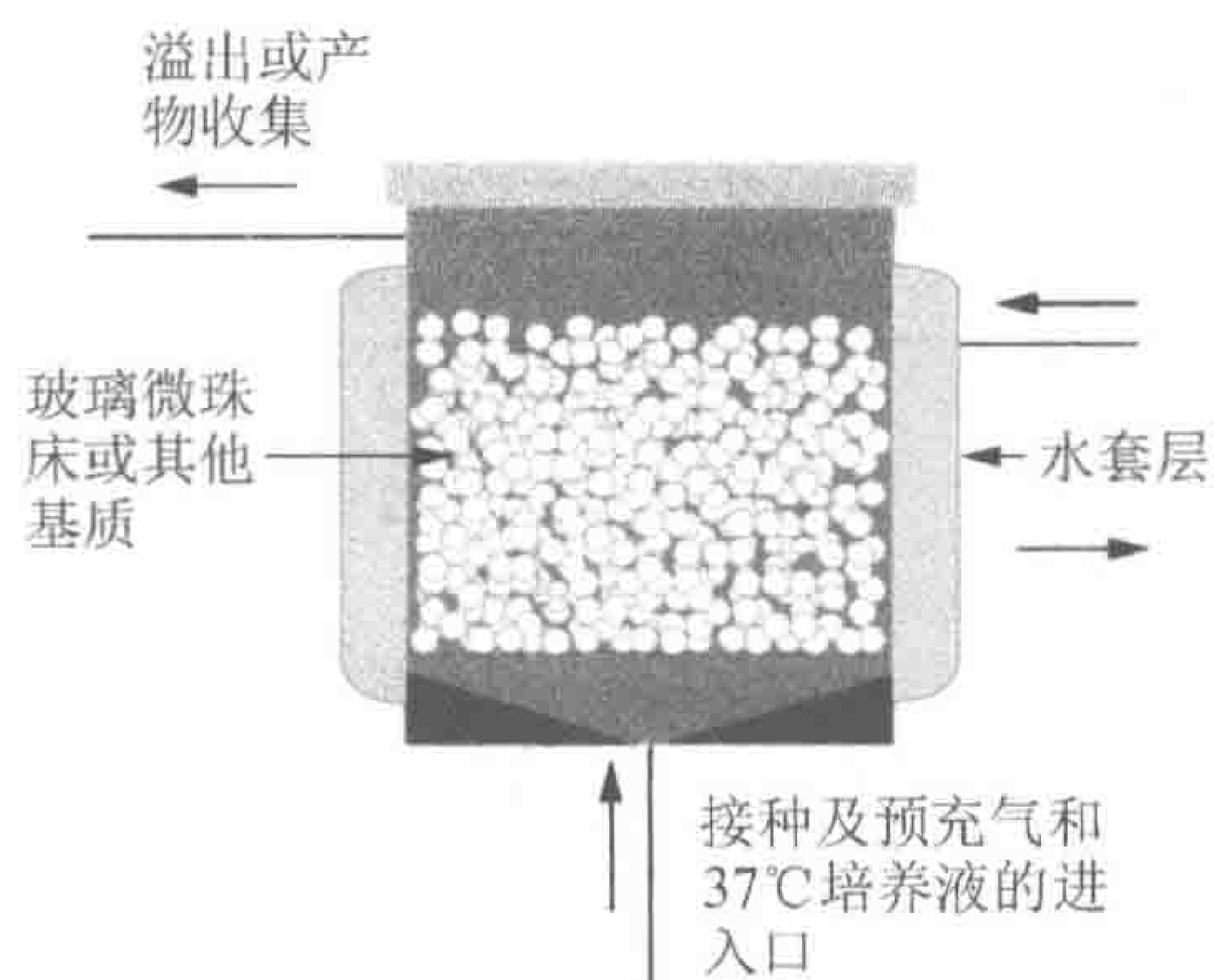


图 21.18 固定床反应器。生长在微珠或巨载体表面上的细胞用培养液灌流。微珠可以是玻璃的、塑料的或多孔陶瓷的，附着于穿孔的培养瓶底部上方的致密床中；或者如果为更轻的材料，可在笼内控制。一旦建立培养，微珠不再移动，培养液在微珠周围渗滤

21.2.5 灌流式单层培养

灌流法广泛地用于促进培养液更换和产品回收。CellCube（Corning）是一种灌流式、多表面和一次性扩增器，生长表面积为 21 250~85 000cm^2（图 21.12），装有附属的泵、氧合器和系统控制器。其他灌流系统在固定床反应器使用附着于巨载体或微珠的细胞（参见下述）。

中空纤维灌流法 有许多中空纤维灌流系统，贴壁性细胞生长在灌流的微毛细管束的外表面上。高分子产物与细胞一起集中在外面空间，而营养物质供给和代谢产物排出经内部空间进行（参见 21.2.5 节；图 21.8）。这些系统对于贴壁性细胞的潜力在于形成较高的组织样细胞密度、基质相互作用和建立细胞极性，所有这些对于蛋白质的后翻译过程和胞吐作用可能是重要的。虽然最初是为贴壁性细胞设计的，但中空纤维系统也广泛地用于悬浮细胞，如杂交瘤细胞（参见 25.6 节）。

固定床反应器 已利用玻璃微珠或基质微珠或巨载体如 FibraCell（New Brunswick）和 FB-Series（Bioreactor Sciences）发明了该系统（图 21.7、图 21.18 和图 21.19，表 21.1），通过固定床向上灌流培养液，或者通过重力向下渗滤（Hatton et al.，2012）。利用储存器中的剩余培养液收集产品（Nehring et al.，2006；Pörtner and Platas Barradas，2007）。

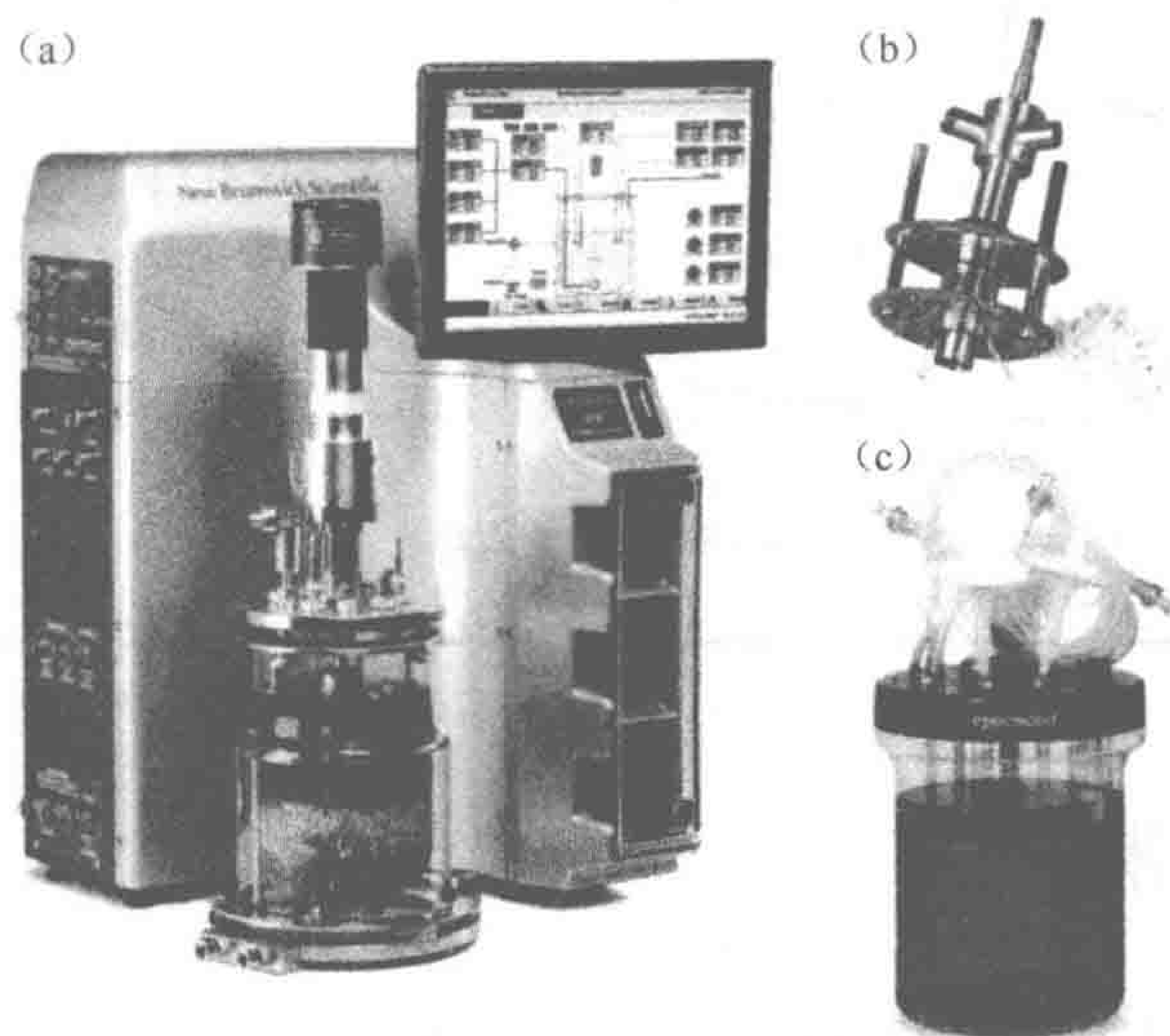


图 21.19 Celligen® 310 生物反应器。（a）培养液中的含有 FibraCel®巨载体的生物反应器室，周围有水夹层围绕，并连于泵和控制单元；（b）推进器和旁边带有 FibraCel®盘的篮筐（经 New Brunswick Scientific 许可）；（c）BioBLU 一次性组装床式生物反应器（Eppendorf）（经德国的 Eppendorf AG 许可，2014 年获得版权）

21.3 程序控制

通过电极在培养物原位检测 pH、O_2、CO_2 和葡萄糖可监控悬浮培养的过程，也可通过分析

营养物质如葡萄糖和氨基酸的利用或代谢产物如乳酸和氨的积累，以及产品如杂交瘤细胞产生的免疫球蛋白进行监控（图 21.20）。从培养物中抽样确定细胞的数量和其他参数如 ATP、DNA 和

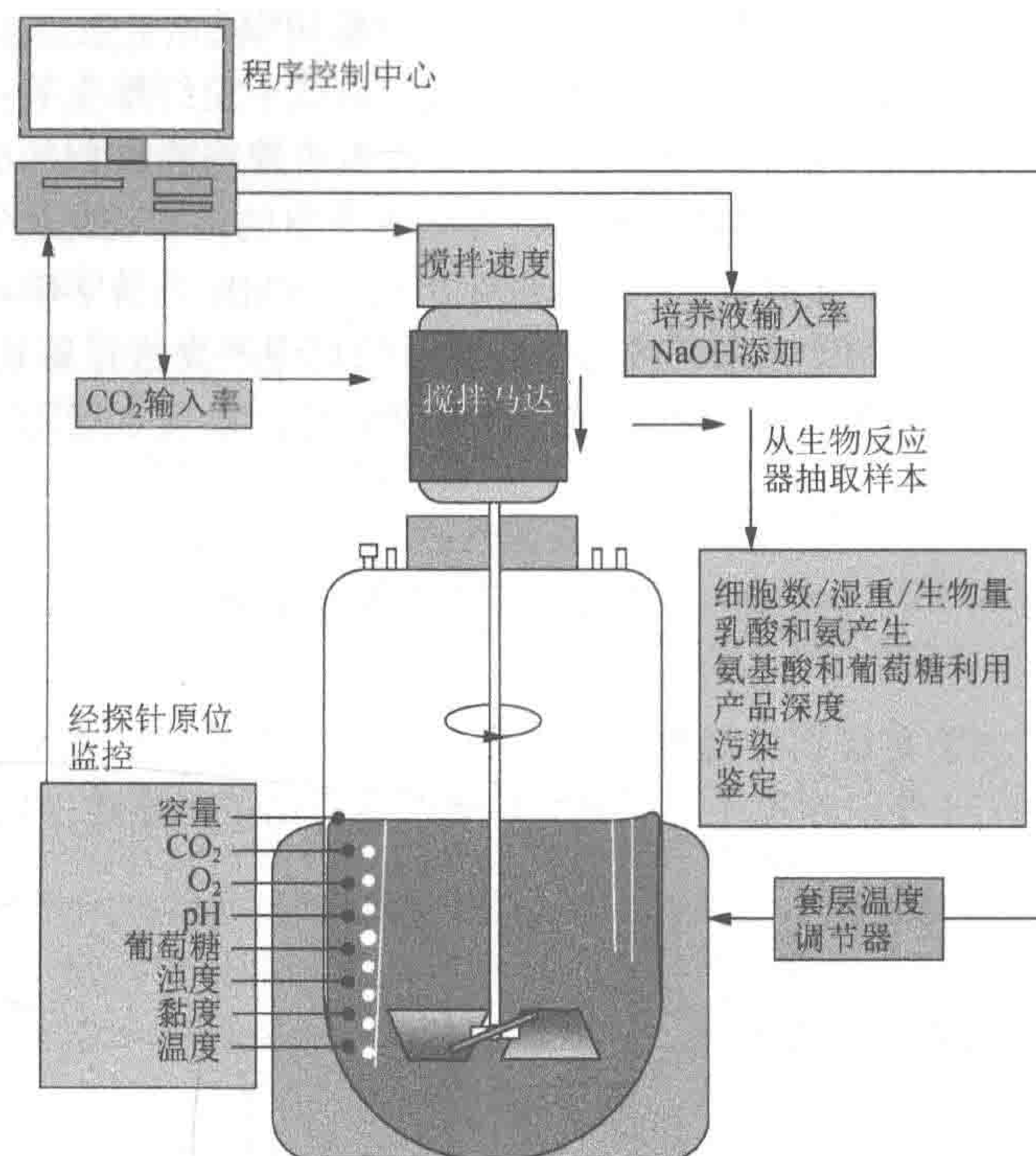


图 21.20 生物反应器的程序控制。短桨搅拌生物反应器的模式图，左侧有直接读数的探测器，输送到一个控制单元（顶部左侧），储存数据并调节生物反应器的条件。右侧的样本孔可从生物反应器抽出细胞悬液进行分析

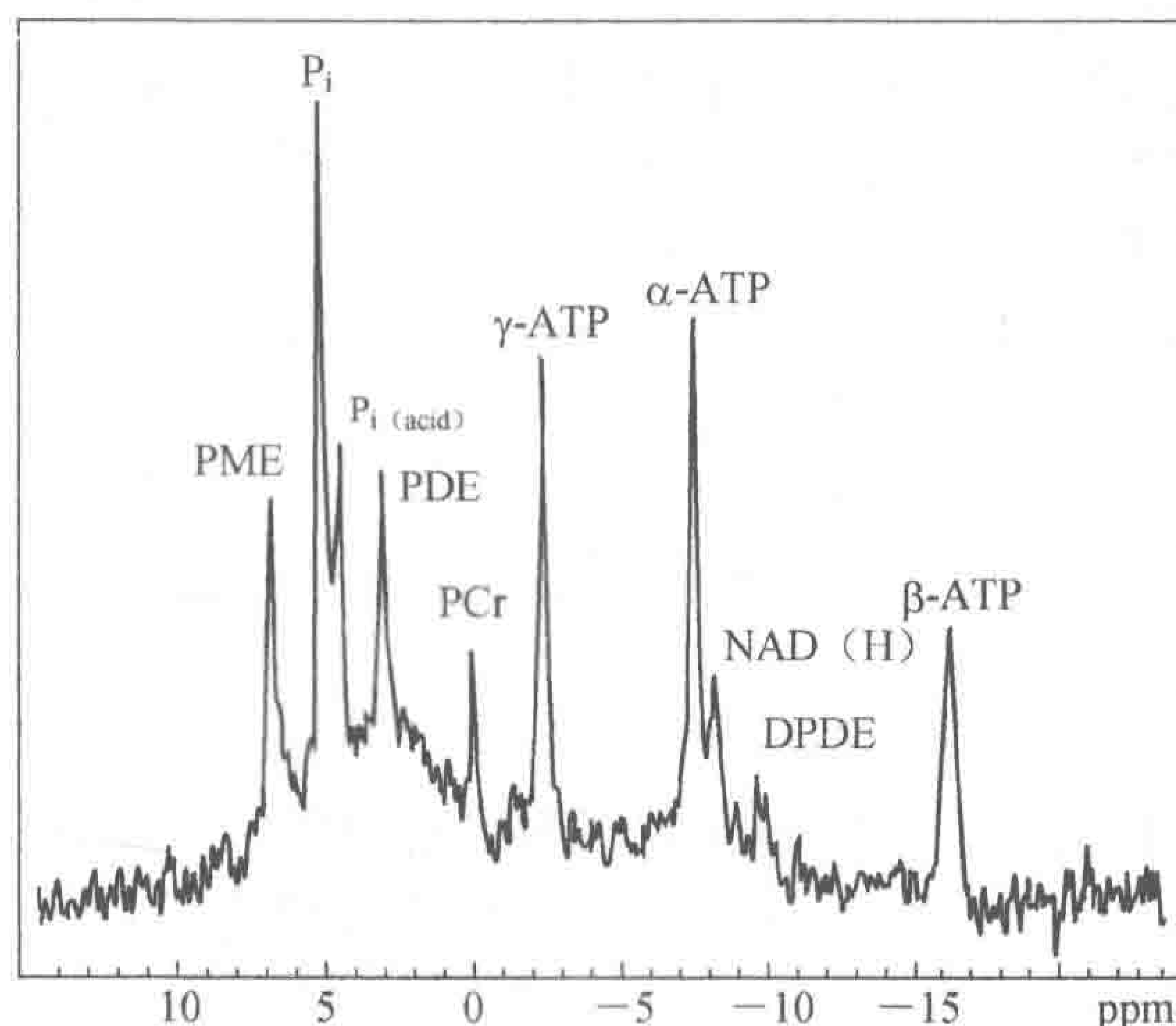


图 21.21 NMR 分析。用 NMR 分析生长在中空纤维中的细胞。此图为生长在中空纤维反应器中的 CHO 细胞的 [^{31}P] NMR 光谱。细胞生长在位于特制中空纤维毛细管外间隙中的大孔微珠上，中空纤维可容纳在直径为 25mm 的 NMR 探头内。细胞密度约为 7×10^7 个/mL。缩写：PME. 磷酸单酯，包括磷酸胆碱和磷酸胆胺；P_i. 细胞外的无机磷；$P_{i\,(acid)}$. 生物反应器内一种酸性（pH 6.7）的细胞外 P_i 池；PCr. 磷酸肌酸；γ-ATP. ATP 的γ-磷酸盐；α-ATP. ATP 的α-磷酸盐；PDE. 磷酸二酯；DPDE. 二磷酸二酯，包括 UDP-葡萄糖；β-ATP. ATP 的β-磷酸盐；NAD（H）. 烟碱-亚丁脱氧核苷酸（简化的）。化学替换模式参照磷酸肌酸为 0.0ppm（经 Kevin Brindle 博士许可；图 20.12）

蛋白质，用于计算总生物产量。培养液的温度可通过加热垫和可加热或冷却的周围水夹层进行调节。如果悬液如生物恒定器那样是流动的，能够控制培养液的流速，并与样本管的输出相匹配（参见21.1.1节）。可根据培养液的黏度调节搅拌速度，以降低切应力。

进行规模单层细胞培养时，尤其在固定床生物反应器或中空纤维生物反应器中培养时，经常出现的问题是：不再可能直接观察细胞，通过细胞计数监控培养过程和确定生物产量也变得困难。解决此问题的方法是利用核磁共振（NMR）对培养小室的内容物进行分析（Brindle，1998；Thelwall et al.，2001；Bartusik et al.，2010）。将细胞放入NMR光谱学磁场中灌流的中空纤维小室内，可产生一种独特的NMR光谱，从而能够对特殊代谢产物进行鉴定和定量（图21.21）。NMR分光仪也能用作成像装置，通过小室产生准光学切片，以显示细胞分布，甚至区分细胞的增殖区和非增殖区。

21.4 大规模培养程序

本章已主要叙述了实验室级别的规模培养，并对应用于实验工厂或半工业级的设备做了说明，但没有叙述大规模工业性培养程序。下列的短篇综述介绍了工业级生物反应器的应用。

短篇综述 21.1 规模培养与生物反应器*

由于培养条件的变化较多，动物细胞的规模培养可能比低级别培养困难，故常需介绍规模培养（参见21.1节和21.2节）。这些变化或许包括合适搅拌引起相应的机械性应力增加、达到较佳产出以减低生产成本所需的较高细胞密度、控制pH和溶解氧（DO）水平时增加通气、变更培养液成分、添加各种化学物质［以保护细胞（如Pluronic F68，Sigma）、最大限度减少泡沫（FoamAway，Life Technologies）和细胞成团（Anti-Clumping Agent，Life Technologies）及新产生的基质（如一次性培养袋）］（参见21.1.2节）。另外，紧密生长在微载体、巨载体或中空纤维壳上时，贴壁依赖细胞容易发生几何变化。

成功的规模培养常需仔细计划，考虑到细胞生物学、生物加工工程、蛋白质化学等方面。对于大规模蛋白质生产，应计划和细致分析下列几步。

（1）细胞和分子生物学（建立细胞系）

（a）产品的性质，如稳定性、产品对于细胞活性的作用、所需的翻译后修饰（包括糖基化）。

（b）可靠的检测方法。应有效和容易实行。

（c）宿主细胞生长的动态变化和克隆细胞的稳定性（产生的克隆细胞数目）。

（d）包括载体和启动子的表达系统。由此制备选择性培养基。

（2）测试、特征化和优化

（a）采集数据，以得出细胞生长率、产出率和特殊要求及确定潜在问题（如特殊添加物质、细胞聚集和切应力敏感性）。

（b）建立细胞库，以保证每次初培养的细胞数目。

（c）确定最合适的运行参数，如pH、DO、营养水平和生产周期。

---

* 由George O. Lovrecz教授（Protein Production and Fermentation，RMIT and Monash University，CSIRO，george.lovrecz@csiro.au）提供。

（3）大规模培养程序的选择

（a）生产方法（成批、流加或连续培养）。

（b）生产器皿或反应器的选择。

（4）监视和控制

（a）原位监视的参数（通过取样或分析）。

（b）需要的取样频率。

（c）自动化水平。

上述大多数事项已在本章或其他章节叙述过，在此只叙述大规模培养程序的选择。

大规模培养程序的选择 基于小规模培养发展的结果，这基本上依赖产物的关键特质（包括生物活性、纯度、需要的无菌程度和常用花费）确定。

虽然连续生产方法（在稳定条件下可达到最高产量和最少产品异质）优于成批和流加方法，最佳和最常用生产方法是成批和流加程序。与连续生产（参见21.1.1节）相比，成批和流加方法的生产周期较短（10~20天），容易实施，很少需要特殊设备（输入和收集泵、储藏器皿）、频繁取样或控制检测。

认真设计和测试的细胞表达系统是可靠的，且选择了生产方法（成批或连续生产），生产器皿的最终选择受最终产物的需要量、设备可靠性和操作者的经验多少的影响。

规模连续 由于单层（贴壁依赖）培养难以操作和监控，近来多数蛋白质生产以悬浮培养进行（参见21.2节）。规模性悬浮培养相当简单，培养容量需增加以达到所需要的细胞量，依次操作能够生产所需的蛋白质量。

规模连续是指将少量细胞向大量细胞相继培养（传代），这需要提前计划。较低培养液中的细胞密度以减少传代次数是理想的，但避免因培养环境的较大变化而引起的细胞生长减缓（如延长停滞期）同样重要。标准方案提出，（2~5）$\times 10^5$个活细胞/mL的细胞密度作为最低细胞接种量，而正常相应稀释5~10倍，即5~10倍规模培养，相比之下微生物规模培养常常是20~100倍。另外，掌握计划使用的器皿和生物反应器的最低容量需要也是重要的，以确保这些器皿和生物反应器的正常运转，如合适搅拌和用于调节pH和DO的合适通气。例如，搅拌系统和波动系统（一次性培养袋）需要的初始细胞量是最终产出量的20%~40%。

旋转瓶和Erlenmeyer培养瓶（E培养瓶，如Fernbach培养瓶，Corning；Thomson培养瓶）一般用于生产足够的细胞，这些细胞再接种于作为中间环节的旋转培养装置、波动培养袋或小型槽状搅拌生物反应器。一个器皿中的细胞达到足够密度［常为（2~5）$\times 10^6$活细胞/mL］时，将细胞移入另一个大的器皿，直至接种于最后生产器皿。表21.2列出了实验室内最常用的器皿。请注意不要将适应悬浮的细胞放入静置器皿内培养，如T培养瓶或各种多层培养系统（如Corning CellSTACK和Nunc Triple-Flask），这是因为悬浮细胞在摇动或搅拌器皿中生长和产出率较高。

表21.2 悬浮培养的规模流程

培养阶段	典型细胞浓度（$\times 10^6$个活细胞/mL）			
	初始培养容量	初始浓度	最终浓度	常用的器皿
细胞复苏（来自冻存）	5~20mL	0.1~0.5	1.0~3.0	E培养瓶、T培养瓶
初代（不超过初培养）	0.1~0.4L	0.2~0.5	2.0~4.0	E培养瓶、摇动瓶
第2代和继代	0.5~2.0L	0.2~0.5	2.0~4.0	E培养瓶、摇动瓶、生物反应器
接种与生产（最终）器皿	>5.0L	0.2~0.5	2.0~10.0	旋转瓶、搅拌或摇动带状生物反应器

生物反应器 可购买到各种用于上述动物细胞大规模扩增的器皿（参见21.1节和21.2节，表21.3）。这里极力推荐用一个器皿作为生产单位，进行规模培养和生产，而不要用几个同样

大小的器皿（超出规模）获得需要量的蛋白质。仅用一个器皿或生产单位可提高加工程序的一致性和降低产品的异质性。

分析 关于达到培养物适当混合及调控pH和溶解氧的通气，不同的生物反应器差别较大。使用不同几何的器皿、搅拌叶片（如斜叶片、Rushton 涡轮或桨叶）和喷射环，由此产生不同的流式和切应力作用。常常难以估计何种类型的生物反应器和最终培养条件对于已定细胞系的特殊培养最理想。例如，在不同器皿用同种培养液培养同种细胞系，可能需要改变实验条件，从而对最终设计需要进行综合性研究（表21.4）。

表21.3 在研究实验室进行规模培养常用的器皿特征

特征	T培养瓶	E培养瓶	摇动瓶	旋转瓶	搅拌罐（传统、一次性用）	摇动系统（带状反应器）
常规容量、单位	10~150mL	20~3000mL	100~500mL	10~5000mL	0.5~2000L	0.5~500L
推荐的最大生产规模	0.1~1L	1~15L	1~20L	1~20L	无设备限制	≤100L
操作难度	易	易	易	难	很难	难至很难
控制的可靠性	温度、pH	温度、pH	温度、pH	温度、DO、pH	全控制（可选择）	全控制（可控制）
组装费（美元）[a]	8~10k（平均大小培养箱）	30~40k（湿润CO_2摇床、培养箱）	16~20k（大培养箱和旋转装置）	16~20k（每4个单位，不包培养箱）	50~70k（实验室规模，达20L）	35~70k（实验室规模，达20L）
预期产出[b]	低	低	低	中等	高	中等、高
产品质量[c]	1~2	2~3	2~3	4	5	4~5
供应商举例	Thermo Corning Sorfa 等	Thermo Corning Nalgene	Thermo Corning Greiner	Thermo Corning Eppendorf/NBS Millipore Techne	Sartorius Eppendorf/ NBS Millipore Applicon	Wave-GE Sartorius Applicon

a 设定具有支撑基本细胞培养的各种服务（包括通气）

b 使用同样培养液和培养制度。产出取决于细胞密度和培养条件

c 估计的异质性（常依赖于对照）。级别为1~5，5为最好

表21.4 用FreeStyle293培养液培养FreeStyle293细胞的参数（Life Technologies）

参数	Optimum Growth™ E培养瓶 Thompson（2.5/5L）	GE-Wave 细胞袋反应器（20/50EH；5~25L）	Eppendorf/NBS、Celligen BLU（14L）
Pluronic F68（Sigma）浓度	无	0.02%	0.01%
通气	顶部空间，经直径0.2μm气阀	顶部空间，0.2~0.3L/min空气	巨喷射，0.3~0.5L/min空气（偶尔O_2）

干细胞研究及其在组织工程和细胞疗法进展迅速。与普通的哺乳动物细胞相比，干细胞特征包括分化潜能、贴壁依赖性强、切应力敏感性高、对生长因子和培养液条件的要求特殊。因此，对于未分化状态细胞设计合适的培养系统是干细胞规模培养的巨大挑战。

由于设备和培养液的要求，目前的方法花费昂贵，且很可能需要进一步完善，以便得到广泛应用。常用于贴壁依赖细胞规模培养的培养板、载体和中空纤维系统等设备需要更改，以满足干细胞的特殊要求。最近可购买到下列培养系统。

（1）静置T培养瓶样培养板：Xpansion（ATMI/Pall）、Cell STACK（Corning）。

（2）基于载体的系统：Mobius CellReady（Merck Millipore）。

（3）基于中空纤维的系统：Quantum Cell Expansion（Terumo）、CellMax（Spectrum Labs）。

（4）Fibercell Bioreactor System（FiberCellSystem）。

应用 自20世纪80年代后期起，制药的生物技术迎来了迅速发展，国际生物制品规模达每年2000亿美元。由动物细胞生产的药物的规模每年增长12%~17%，而其他药物为4%~12%。1/3生物制品是单克隆抗体（Evaluate Pharma，McKinsey报告）。曾预测2016年前销售前10种药物中的8种是生物制品，这进一步强调了生物制品比小分子药物更重要（BtoBioInnovation）。

由于患者用于生物制品治疗的估计费用几乎是经典小分子药物的20倍（So and Katz，2010），政府承诺实行费用围堵政策。另外，事实上药物发明包括临床试验是一项昂贵的实践，花费10亿~15亿美元。这样，强迫制药公司在发明新方法上大力投资，以保证最大产出和持续生产靶向蛋白质。与10年前应用的细胞系相比，现代基因工程化细胞系用限制培养液培养，具有高而特殊的生产能力（由每个细胞每天产出为皮克级提高至微克级），可以高密度生长（2×10^6~150×10^6个/mL），耐受能力和存活良好。结果，成批培养系统的常规工业级程序能够产出3~6g/L单克隆抗体。这些显著进展主要归功于优化而高产出的克隆和筛选方法、细致研究的培养策略和系统性实验设计（参见下列的PAT和QbD倡议）。产量超过4g/L时，这种高产出允许经济使用500~2000L工作量的生物反应器，而不是传统的>5000L生物反应器，按商品成本计算小容量生物反应器和大容量生物反应器的差别只有5%~10%。

对于较快进入市场的灵活性和较短周期的需求不断增加，结合小生物反应器的经济使用，促进了一次性生物反应器的发明。可购置几种摇动（波动培养袋）搅拌（HyClone、Sartorius等）一次性生物反应器，这种反应器很适合于研究和生产（参见21.1.2节）。典型的研究级一次性生物反应器的容量在波动袋或搅拌袋为10~100L，而用于工业级生产的一次性搅拌生物反应器≤3000L。可参考Shukla和Gottschalk（2013）的总结。

与传统的不锈钢生物反应器相比，一次性生物反应器的明显优点是简化操作（如快速安装、很少整体试验、容易拆解）和大大降低投资成本。估计一次性生物反应器用于大规模药物生产时商品成本可降低至≤40%。

自一次性培养系统问世以来，敏感性和一些培养加工参数的控制需要改变。常用光学探头检测pH和可溶性氧的水平。仅用加热垫控制温度，而不用加热和冷却的水槽。

加工分析技术（PAT）和通过设计提高质量（QbD） 生产质量管理规范的条件下必须进行大规模生物药物生产时，用固定程序进行生物加工是不利于生产的，而生物加工应是可变的（规模依赖、细胞生理变化和批次性粗产品的差别），这种情况自2000年变得更加明显。固定程序不能满足最终产品的质量，结果导致产品废弃甚至财政损失。近来的观点是，应仔细研究、特别处理和掌握特殊的培养和纯化系统，设计一个保证最终产品的质量的程序。请详细参考生物加工发展的个案研究A-Mab。大的制药公司如Pfizer、Genentech和Amgen成立了工作组，并公布了新的倡议A-Mab 2009。另外，也可参考美国食品药品监督管理局的倡议和欧盟的管理和协调标准（ICH质量指南）。

展望 关于使用新的细胞系如PER.C6@（Crucell）和新技术，药物工业的观点非常保守，这是因为这些常常会减慢规则的认可，从而延缓产品上市。但是，降低生产成本的压力增加或许会使得这种观点改变。

另外，期望将增加产出、使用一次性生物反应器与快而成本低的定点照护诊断工具相结合，开辟加强应用个体化医学（PMC）和干细胞疗法的可能性。

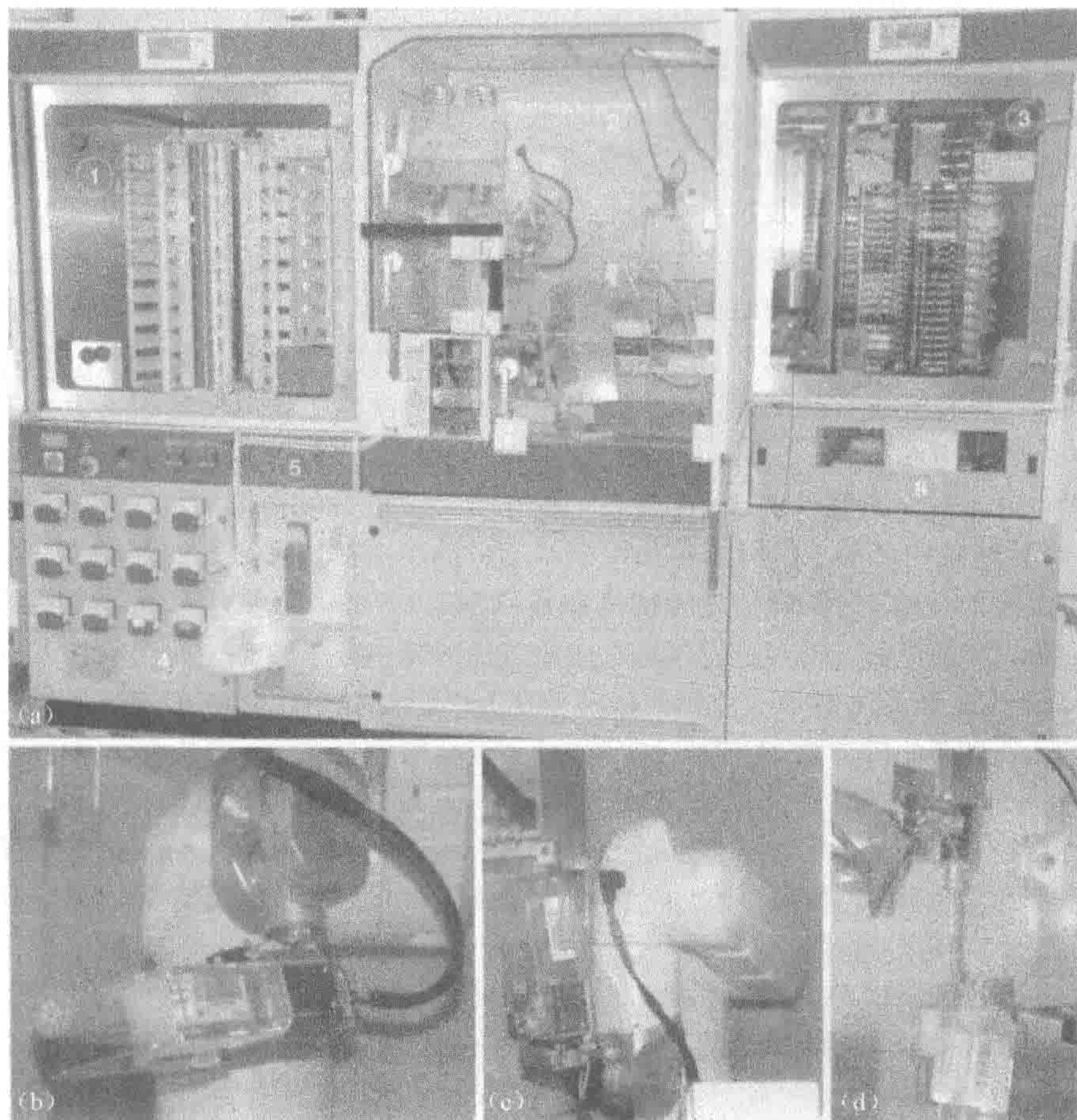
21.5 自 动 化

在叙述规模培养的许多程序中暗示的是某些自动化程度的改良。生物反应器自动培养和收获

产品（图 21.3 和图 21.20），许多其他装置通过反馈调节 pH 和营养成分的浓度连续检测物理化学和生理学参数（参见 21.3 节）。然而，对于高产量检测多次重复的自动化常规培养、传代操作和大规模人工操作总是需要的。在此将机器人学引入细胞培养，一方面是为了用常规培养瓶进行大规模生产，另一方面为了每天处理和分析十位、千位份微样本。

21.5.1 机器人培养细胞

最广泛使用的一个机器人是 Cellmate（The Automation Partnership，TAP），该机器人会操作常规培养瓶和旋转培养瓶，并通过酶消化或机械分离进行传代（图 21.22；彩版 24c）。其他机器人能够扩增胚胎干细胞培养物，用于组织工程，并能够组装培养板以筛选产品（CompacT SelecT）。正如在密闭环境中进行的所有操作一样，可以有效地防止污染。机器人能够长期持续工作，以供给新鲜培养液和接种细胞。这种免费的专业职员能够进行更多高要求的操作。




彩版 24

图 21.22 机器人细胞培养。CompacT SelecT 细胞培养机器人系统。（a）前面：①左上方装有培养瓶的培养室；②在中央，数字左下有机器人臂的主要操作室、加盖/不加盖和分发单元，数字下面有吸管容器；③平板培养室；④添加培养液的蠕动泵；⑤Cedex 细胞计数器（Innovartis）；⑥多孔板液体操作单元（见彩版 24c）；（b）在机器人臂抓手中的培养瓶，显示培养瓶正在摇动，也可从一边向另一边摇动；（c）未加盖，将盖放在装置上，培养瓶放回原处时再加盖；（d）从前面的培养瓶吸取细胞悬液至后面的培养瓶（得到 TAP Biosystems 的许可，现在更名为 Sartorius Stedim）

CompacT SelecT 系统已应用于药物研制（Cawkill and Tucker，2008；Liu et al.，2008）和干细胞生产（Thomas et al.，2007）等许多方面（Gryseels，2008）。CompacT SelecT 系统和许多其他机器人系统（如 Microlab Star 和 Vantage，Hamilton）设计为操作多孔培养板和微培养板，为基于细胞的高产量检测提供多次重复性操作（图 21.22 a 中的 3 区和 6 区）。

21.5.2 高通量筛选（HTS）

通过原位数字图像记录在常规培养中自动得出生长曲线已有一些成功的尝试，这不但对于分析研究而且对于一般性维持培养是有用的（参见 23.9.3 节，图 23.11），可用在与机器人系统如 CompacT SelecT（TAP Biosystems）连接。这些系统也适合用多孔培养板和微培养板，且能在选定孔按计划进行观察。另外，有多种带图像监视的平行微型生物反应器系统如 PANsys 4000（Pan-Systech）、Hexascreen（Hexascreen CT）和 ambr15（图 21.23；TAP Biosystems）。机器人的纳米级筛选可以在微灌流培养板上进行（Barbulovic-Nad et al.，2010）（见短篇综述 21.1）。

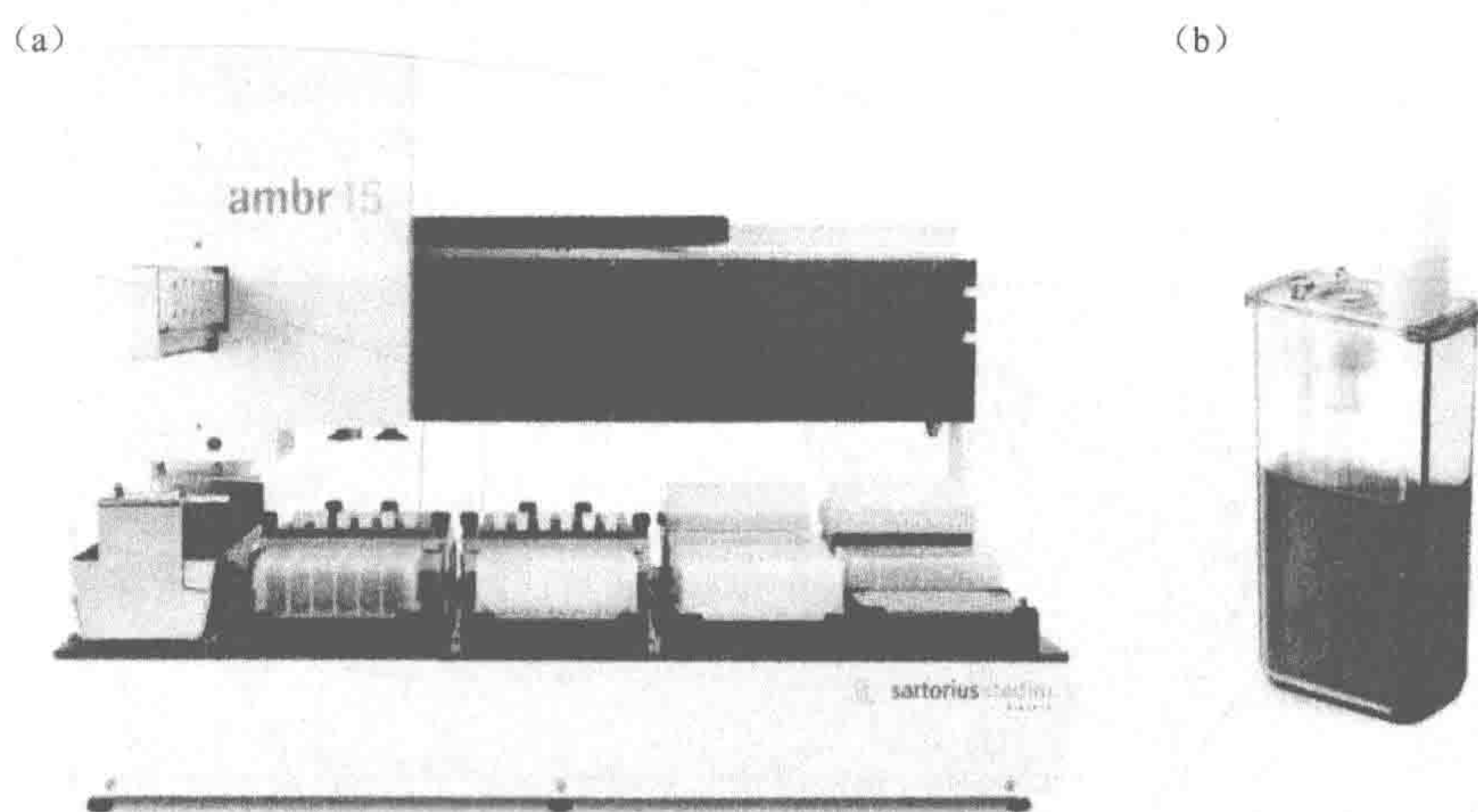


图 21.23 机器人筛选。TAP Biosystems-Sartorius ambr15 小型生物反应器筛选系统。（a）控制单元。如果安装 Vi-CELL（Bechman Coulter），可调控每个器皿中 O_2 和 CO_2 浓度、培养液添加、细胞计数和细胞活性；（b）小型生物反应器。一次加工容量可为 15~48mL（经 Sartorius Stedim 许可）

虽然术语细胞容量、细胞数目和大多数工业化细胞培养产量用于生物药物的生产，但在许多个体培养操作中所谓的细胞产量是指向细胞表型、表达分析、对实验性药物的反应或细胞毒素进行筛选，这需要大量增加小细胞样本，通常是在某种微孔培养板内或者在能通过微阵列分析的显微载片列阵中进行（Fernandes et al.，2009；Kikuchi et al.，2009）。一些这样的微灌流系统用特殊组建的中央带有芯片的微灌流培养板（图 21.24）以纳升容量运作，常以荧光形式用专用的检测器读该芯片。细胞反应可在原位用专用的检测器记录并通过下游计算机分析系统处理。这些系统有两个主要优点：①能够同时对比较少的细胞的超大量样本进行分析；②以最小的人工干预瞬间记录和处理实验资料。

21.5.3 三维高通量筛选

现在有多种用于三维培养细胞的高通量筛选的系统，其中一种系统用 348 孔板的悬滴生长细胞筛选（Hsiao et al.，2011）（参见 20.3.4 节和短篇综述 20.1）。

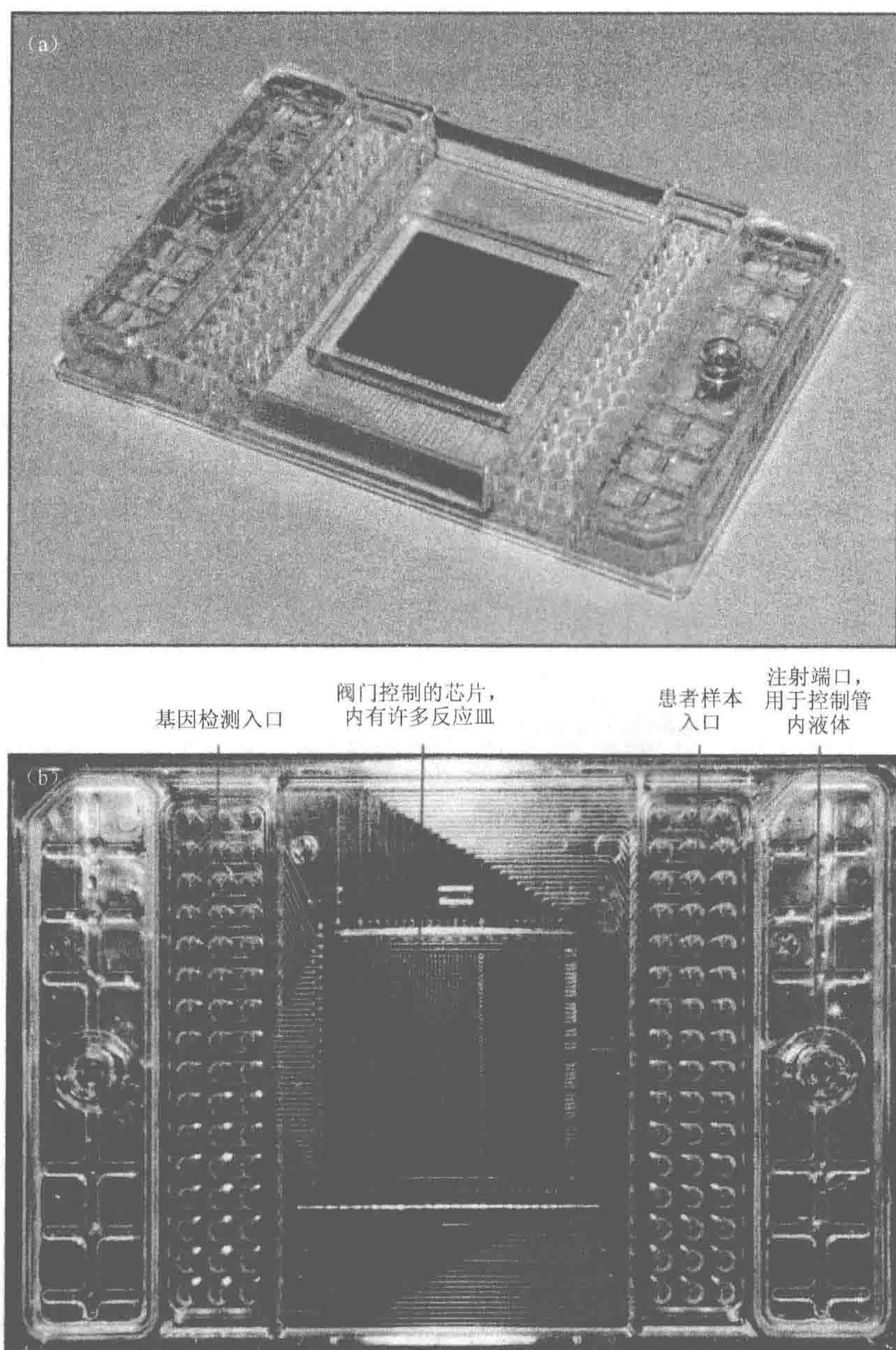


图 21.24 分析用微灌流培养板。微板微灌流装置用于同时检测多个纳升样本。（a）斜面观；（b）平面观（英国 Glasgow 市的 Paul O'Gorman Leukaemia Research Centre 馈赠）

短篇综述 21.2 微灌流细胞培养*

微灌流细胞培养与培养板和培养瓶的常规培养相比具有多种优点。

（1）小规模的微灌流细胞培养系统大大减少昂贵的培养液和添加物质的需要量。

---

* Kaunas R（Department of Biomedical Engineering，Texas A&M University，rkaunas@tamu.edu）提供。

（2）通过递送可溶性分子和构建黏附性接触面（Folch 2000）的时空控制，精确限定细胞局部微环境。

（3）培养液的流动性克服物质扩散限制的细胞生长，从而促进需要局部对向运输营养物质和废物的三维基质应用。

（4）微灌流整合各种特征，使得样本在装置内检测和机械驱动动态地改变液流。

然而，使用微灌流系统时应考虑到制造材料的选择、液体流力的作用和限制接触内部的组件等事项。

微灌流培养的应用 灌注培养特别适合于高灌注组织的细胞培养，如肝（Leclerc et al.，2003）和肾（Jang and Suh，2010）。例如，将被有孔膜分隔的两层聚二甲硅氧烷（PDMS）构成的装置用于培养原代大鼠肾髓质集合管细胞，在生理方面细胞顶部接受相当水平的液体切应力，而细胞底外侧部周围为静止的含液体小室，从而产生单层构筑和跨上皮转运特性，这种特性对玻璃上培养的细胞是不存在的（Jang and Suh，2010）。这样，可以用多层PDMS制成多功能装置，以综合体现特殊组织的特征。除液体切应力外，细胞可受张力的影响。环行牵张力和液体切应力可以在将灌流微管一分为二的薄而有弹性的PDMS上同时建立，在夹有气体的槽内施行环行真空以产生牵张力（Zheng et al.，2012）。

微灌流装置为研究细胞在三维基质内迁移提供了一个很好的系统。胶原蛋白可经相贴的贴片注入两条平行微管之间，通过贴片的表面张力限制胶原蛋白流动（Shin et al.，2012）。流经相邻微管的培养液和趋化因子的浓度引起基质内的培养液流动和趋化梯度，从而刺激内皮细胞定向迁移和形成网状管样结构（Shin et al.，2012）。

装置构件和运转 典型的微灌流装置制作是将PDMS注于定型的硅胶薄片上，然后在80℃烤箱内处理1h。PDMS为惰性和无细胞毒性时，必须作表面处理如吸收细胞外基质蛋白，以促进细胞直接黏附在PDMS表面上（Halldorsson et al.，2015）。PDMS常融合于玻璃上，成为细胞附着的表面。如果足够薄（约100μm），PDMS有着很高的气体通透性，这促进CO_2培养箱内培养液pH的维持。既然PDMS对水蒸气也有通透性，如果培养小室的外部环境干燥，培养液蒸发可引起其摩尔渗透浓度的变化（Heo et al.，2007）。简单的解决方法是在种植细胞前24h用培养液浸透PDMS微灌流装置。另外，PDMS允许疏水的大分子物质通透，这可显著降低其在培养液中的浓度。

灌注 微灌流装置内的培养液流动可由简单的重力或较精确控制的外在泵驱动。PDMS的自然可塑性允许结合瓣膜和芯片上的泵（Meyvantsson and Beebe，2008）。与传统培养相比，微灌流系统内的对流大幅度地减少用于一定数目细胞的培养液和昂贵添加剂。液体流动产生的切应力对细胞有害，影响贴壁较弱的细胞。这对细胞开始贴壁特别重要，应暂时停止灌流，直至细胞充分贴壁。需在细胞贴壁时间和为了细胞存活需要更换培养液之间找到平衡。对于具有贴壁较弱特征的细胞如造血干细胞，可将细胞培养区与整体培养液流动隔开，扩散距离应足够短，但应保证营养物质和废物的合适输送（Lecault et al.，2011）。

如19.7.5节所及，有时特意地将液体切应力用于提供生理学相关的生物力学变化。例如，将淋巴管内皮细胞种植于灌流管内，检测液体切应力引起的细胞内钙离子信号的转导（图21.25）（Jafarnejad et al.，2015）。在这种简单细胞构型，整片培养细胞的切应力幅度是一致的。在单一装置内，可通过变化灌流管的横断面积，建立液体切应力变动范围的不同细胞区。微灌流的另一显著特征是层流，通过集合不同浓度分子的多种流动形成稳定的浓度梯度，如研究细胞能动性的趋化剂（Li Jeon et al.，2002）。

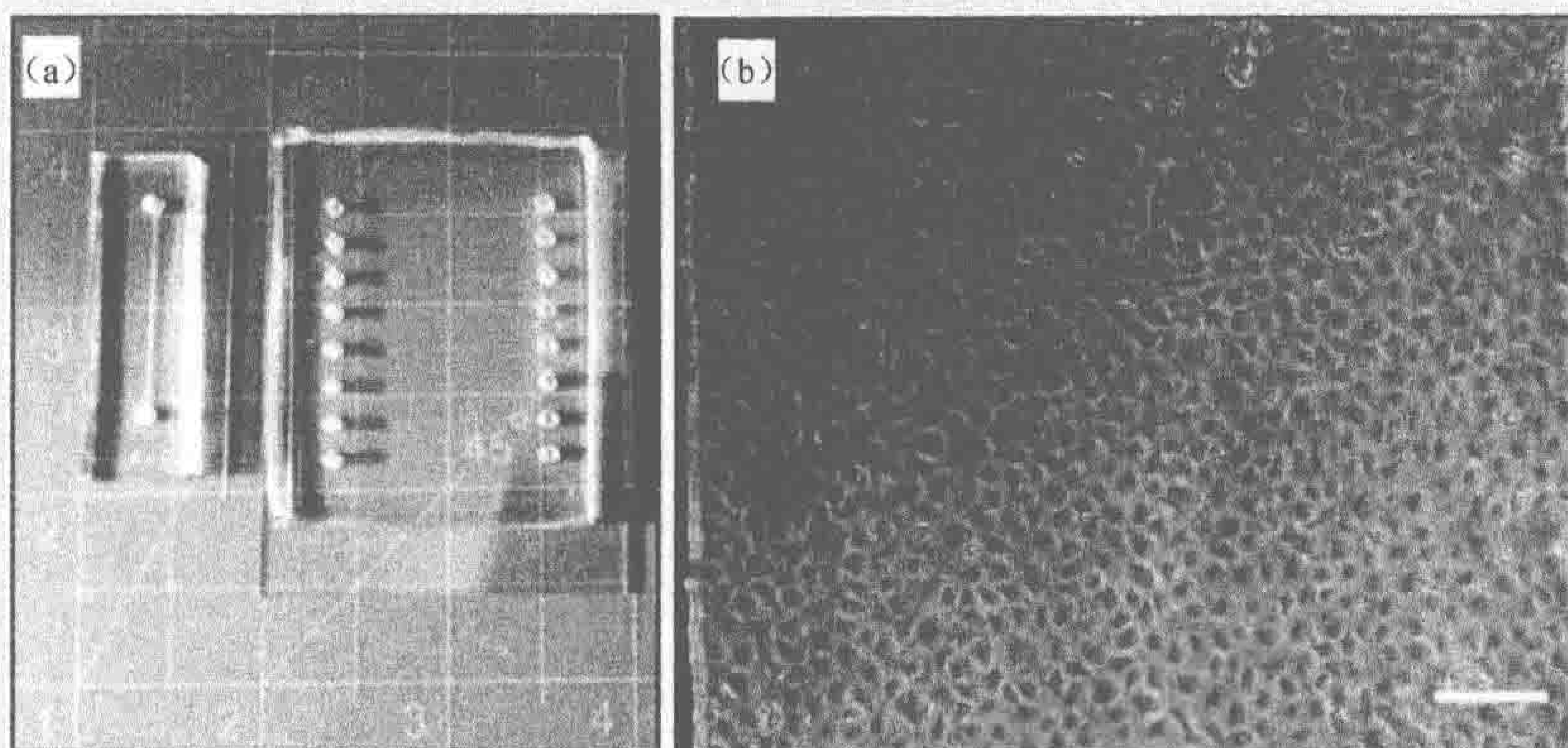


图 21.25 微灌流培养。控制液体切应力的微灌流装置。（a）装置的单、多灌流管构型。在这两种构型中，每条灌流管有入口、出口各一个，分别连有插管；（b）灌流管内培养的单层人淋巴管内皮细胞的相差显微镜图像。在左、右边可见灌流管的边缘。标尺为 100μm

分析 PDMS 的透明特征和连续灌流促进对培养的细胞进行长期成像。这样，微灌流系统对于基于荧光探针或形态学测量的实验很理想。少量细胞和密闭系统限制接近细胞对于进行如常规培养板上细胞的终端实验是一挑战。整个细胞和溶解细胞可分别通过经装置灌流胰蛋白酶和细胞溶解缓冲液获得，尽管在这一过程中丢失大量物质。包括 RT-PCR 和细胞计数在内的巨视实验的不同版本芯片正在研发中（Yi，2006；Dittrich，2006）。

参考文献

A-Mab: *A case study in bioprocess development*, CMC Biotech Working Group, Version 2.1. (2009) (file:///C:/Users/Ian/Downloads/A-MabCaseStudyVersion%20(2).pdf).

Aunins JG, Bader B, Caola A, Griffiths J, Katz M, Licari P, Ram K, Ranucci CS, Zhou W. (2003). Fluid mechanics, cell distribution, and environment in CellCube bioreactors. *Biotechnol. Progress* **19**:2–8.

Badenes SM, Fernandes TG, Rodrigues CA, Diogo MM, Cabral JM. (2015). Scalable expansion of human-induced pluripotent stem cells in xeno-free microcarriers. *Methods Mol. Biol.*, 1283:23–29. (PMID: 25108454.

Barbulovic-Nad I, Au SH, Wheeler AR. (2010). A microfluidic platform for complete mammalian cell culture. *Lab Chip (Lab-on-a-Chip journal)* **10**:1536–1542.

Bartusik D, Tomanek B, Lattová E, Perreault H, Fallone G. (2010). Ex vivo assays of CEM cells cultured and treated in the three dimensional cultures. *Biomed. Pharmacother.* **64**:390–395.

Brindle KM. (1998). Investigating the performance of intensive mammalian cell bioreactor systems using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **15**:499–520.

Butler M. (2004). *Animal cell culture and technology*, 2nd ed. London and New York: Bios Scientific Publishers.

Cawkill D, Tucker SJ. (2008). Generating cell lines for early drug discovery. *BIOForum Eur.* **9**:46–47.

Dittrich PS, Tachikawa K, Manz A. (2006). Micro total analysis systems. Latest advancements and trends *Anal. Chem.* **78**:3887–3907.

Evaluate Pharma (www.evaluategroup.com/public/reports/EvaluatePharma-World-Preview-2014.aspx).

FDA (2004). *Pharmaceutical cGMPs for the 21st century–a risk based approach* (final report, Sept. 2004) (www.fda.gov/oc/cgmp),

Fernandes TG, Diogo MM, Clark DS, Dordick JS, Cabral JM. (2009). High-throughput cellular microarray platforms: Applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. *Trends Biotechnol.* **27**:342–349.

Folch A, Toner M. (2000). Microengineering of cellular interactions. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**:227–256.

Goosen MF. (1991). Large-scale insect cell culture: Methods, applications and products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**(3):365–369.

Griffiths B. (2000). Scaling up of animal cell cultures. In Masters JRW (ed.), *Animal cell culture, a practical approach*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, pp. 19–67.

Gryseels T. (2008). Considering cell culture automation in upstream bioprocess development. *Bioprocess Int.* **6**:12–16.

Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells–where do we go from here? *Biotechnol. Adv.* **27**:1023–1027.

Halldorsson SE, Lucumi R, Gomez-Sjoberg, R., Fleming RM. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* **63**:218–231.

Hatton T, Barnett S, Rashid K. (2012). *CHO cell culture with single-use New Brunswick™ CelliGen® BLU packed-bed Fibra-Cel® basket*. Eppendorf Application Note 254 (http://newbrunswick.eppendorf.com/fileadmin/nbs/data/pdf/AA254_CHO_culture_BLU_Fibra-Cel.pdf).

Heo YS, Cabrera LM, Song JW, Futai N, Tung YC, Smith GD, Takayama S. (2007). Characterization and resolution of evaporation-mediated osmolality shifts that constrain microfluidic cell culture in poly(dimethylsiloxane) devices. *Anal. Chem.* **79**:1126–1134.

Ho L, Greene CL, Schmidt AW, Huang LH. (2004). Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. *Cytotechnology* **45**(3):117–123.

Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S. (2011). 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:1293–1304.

ICH (International Conference on Harmonization) Quality Guidelines (http://www.ich.org/products/guidelines/quality.html).

Ismadi MZ, Gupta P, Fouras A, Verma P, Jadhav S, Bellare J, Hourigan K. (2014). Flow characterization of a spinner flask for induced pluripotent stem cell culture application. *PLoS ONE* **9**(10):e106493.

Jafarnejad M, Cromer WE, Kaunas R, Zhang SL, Zawieja DC, Moore JE Jr. (2015). Measurement of shear stress-mediated intracellular calcium dynamics in lymphatic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 308:H697–706. PMID: 25617358.

Jang KJ, Suh KY. (2010). A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab Chip* **10**(1):36–42.

Kikuchi K, Sumaru K, Edahiro J, Ooshima Y, Sugiura S, Takagi T, Kanamori T. (2009). Stepwise assembly of micropatterned co-cultures using photoresponsive culture surfaces and its application to hepatic tissue arrays. *Biotechnol. Bioeng.* **103**:552–561.

Lecault V, Vaninsberghe M, Sekulovic S, Knapp DJ, Wohrer S, Bowden W, Viel F, McLaughlin T, Jarandehei A, Miller M, Falconnet D, White AK, Kent DG, Copley MR, Taghipour F, Eaves CJ, Humphries RK, Piret JM, Hansen CL. (2011). High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays. *Nat. Methods* **8**:581–586.

Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. (2003). Cell culture in a three-dimensional network of PDMS. (polydimethylsiloxane) microchannels. *Biomed. Microdev.* **5**:109–114.

Li Jeon N, Baskaran H, Dertinger SK, Whitesides GM, Van de Water L, Toner M. (2002). Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat. Biotechnol.* **20**:826–830.

Liu JY, Hafner J, Dragieva G, Burg G. (2004). Bioreactor microcarrier cell culture system (Bio-MCCS) for large-scale production of autologous melanocytes. *Cell Transplant.* **13**:809–816.

Lou Z, Wang Y, Nawoschik S, Riddell D, Martone R, Dunlop J. (2008). Implementing CompacT SelecT automated cell culture in support of Alzheimer's disease-targeted drug discovery. *JALA (Journal of Laboratory Animation)* **13**:3,

Martin Y, Eldardiri M, Lawrence-Watt DJ, Sharpe JR. (2011). Microcarriers and their potential in tissue regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* **17**(1):71–80.

McKinsey Report (www.mckinsey.com/insights/pharmaceuticals_and_medical_products).

Meyvantsson I, Beebe DJ. (2008). Cell culture models in microfluidic systems. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**:423–449.

Mizrahi A, Moore GE. (1970). Partial substitution of serum in hematopoietic cell line media by synthetic polymers. *Appl. Microbiol.* **19**(6):906–910.

Nehring D, Gonzalez R, Pörtner R, Czermak P. (2006). Experimental and modelling study of different process modes for retroviral production in a fixed bed reactor. *J. Biotechnol.* **122**:239–253.

Nienow AW. (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* **50**:9–33.

Park JH, Pérez RA, Jin GZ, Choi SJ, Kim HW, Wall IB. (2013). Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone. *Tissue Eng. Part B Rev.* **19**:172–190.

Parmar N, Ahmadi R, Day RM. (2015). A novel method for differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth muscle-like cells on clinically deliverable TIPS microspheres. *Tissue Eng. Part C Methods*, 21:404–412. (PMID: 25205072).

Personalized medicine (http://personalizedmedicinecoalition.org/Resources/Personalized_Medicine_101_The_Challenges).

Pörtner R, Platas Barradas OBJ. (2007). Cultivation of mammalian cells in fixed-bed reactors. *Anim. Cell Biotechnol. Methods Protoc.* **24**:353–369.

Sen A, Kallos MS, Behie LA. (2002). Expansion of mammalian neural stem cells in bioreactors: Effect of power input and medium viscosity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **134**(1–2):103–113.

Shin Y, Han S, Jessie S Jeon, Yamamoto K, Zervantonakis IK, Sudo R, Kamm RD, Chung S. (2012). Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat. Protoc.* **7**:1247–1259.

Shukla AA, Gottschalk U (2013). Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends Biotechnol*, 31:147–54. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.004.

So AD, Katz SL. (2010). Biologics boondoggle. *NY Times* (March 7, 2010).

Stem cell therapies (www.closerlookatstemcells.org/Top_10_Stem_Cell_Treatment_Facts.html).

Tharmalingam T, Ghebeh H, Wuerz T, Butler M. (2008). Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Mol. Biotechnol.* **39**:167–177.

Thelwall PE, Neves AA, Brindle KM. (2001). Measurement of bioreactor perfusion using dynamic contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging. *Biotechnol. Bioeng.* **75**:682–690.

Thomas RJ, Chandra A, Liu Y, Hourd PC, Conway PP, Williams DJ. (2007). Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform. *Cytotechnology* **55**:31–39.

Varley J1, Birch J. (1999). Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* **29**(3):177–205.

Yi CQ, Li CW, Ji SL, Yang MS. (2006). Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Anal. Chim. Acta* **560**:1–23.

Zheng W, Jiang B, Wang D, Zhang W, Wang Z, Jiang X. (2012). A microfluidic flow-stretch chip for investigating blood vessel biomechanics. *Lab Chip* **12**(18):3441–3450.

（谭玉珍 译）

第 22 章

衰老，永生化和转化

转化（transformation）一词最先出现在微生物学，指因摄入新的遗传物质而导致的表型改变。虽然这个过程现在可以人工在哺乳动物细胞中完成，但它被称为转染（transfection）或 DNA 转移（DNA transfer），以与转化一词区分。培养细胞的转化是指由于 DNA 的可遗传改变和基因表达引起的自发或诱导的永久性表型改变。转化可以通过转化病毒感染（如多瘤病毒）或基因转染（如突变 *ras* 基因）获得，也可以自发产生，或在暴露于电离辐射或化学致癌剂后产生。

转化与遗传不稳定性（genetic instability）有关，有 3 类主要的表型改变，一个细胞株可出现其中一种改变，或 3 种改变都出现：①永生化（immortalization），获得无限的寿命；②生长控制异常（aberrant growth control），丧失细胞迁移的接触抑制、细胞增殖的密度限制和停泊依赖；③恶性化（malignancy），以在体内形成具侵袭性的肿瘤为依据。此处使用的转化一词包括这 3 个过程，如果只获得无限寿命这一项则被称为永生化，即使不具备生长控制异常和恶性化这两个特征也可以获得，虽然它们常常相互关联。

转化是一系列既依赖又促进遗传不稳定性事件的结果（Fearon and Vogelstein，1990；Pinto and Clevers, 2005）。它改变了细胞系的许多性质，包括生长率、生长方式（贴壁或悬浮）、特定产物的形成、寿命和致瘤性等（表 22.1）。

表 22.1　转化细胞的性质

性质	检测	方案，图表，或参考文献
生长		
永生化	生长超过 100pd	见短篇综述 22.1（Kopper and Hajdu，2004；Meeker and DeMarzo，2004）
无锚定依赖	在琼脂中克隆；可在搅动的悬液中生长	见方案 16.4、方案 16.5、方案 12.5
接触抑制丧失	显微镜观察；缩时摄影	见图 18.7，彩版 14
在汇合成单层的同源细胞上	形成灶	见方案 25.8，彩版 14c
生长的密度限制降低	高饱和密度；饱和密度下的高生长分数	见方案 22.3、方案 23.7、方案 23.8、方案 23.12
低血清需要	限制血清中克隆	见方案 23.10、方案 24.3
无需生长因子	限制血清中克隆	见方案 23.10、方案 24.3
产生自分泌生长因子	免疫染色；在条件培养基和限制血清中克隆；受体-阻断抗体或肽抑制物	见方案 18.6、方案 23.10、方案 24.3
产生转化生长因子	NRK 悬浮克隆	见方案 16.4、方案 16.5
高贴壁效率	限制血清中克隆	见方案 23.10、方案 24.3



彩版 14

续表

性质	检测	方案，图表，或参考文献
群体倍增时间缩短	生长曲线	见方案23.7、方案20.8
遗传		
高自发突变率	姐妹染色单体互换	见方案24.5-Su
非整倍体	染色体组成	见方案13.4
异倍体	染色体组成	见方案13.4
癌基因过度表达或突变	Southern 印迹，FISH，免疫染色；微矩阵分析	见方案18.6，彩版24a（Ausubel et al.，2009）
抑癌基因缺失或突变	Southern 印迹，FISH，免疫染色；微矩阵分析	见方案18.6，彩版24a（Ausubel et al.，2009）
基因或染色体易位	FISH，染色体着色	—
结构		
细胞骨架肌动蛋白改变	免疫染色	见方案18.6
细胞表面相关的纤连蛋白	免疫染色	见方案18.6
细胞外基质改变	免疫染色；DEAE 色谱分析	见方案18.6（Glimelius et al., 1979）
细胞黏附分子（CAM、钙黏蛋白、整合素）表达改变	免疫染色	见方案18.6
细胞极性的破坏	免疫染色；滤膜孔的极性转运实验	见方案18.6（Halleux and Schneider，1994）
肿瘤的特征		
致瘤性	裸鼠或scid小鼠异种移植	Giovanella et al.，1974；Russo et al.，1993
血管发生	CAM 分析；滤膜孔；产生 VGEF	见方案22.4，彩版15 e、f、g（Ment et al.，1997；Buchler et al.，2004）
蛋白酶分泌增加（如纤溶酶原活化因子）	纤溶酶原活化因子鉴定	见图22.11（Whur et al.，1980；Boxman et al.，1995）
侵袭性	器官样对抗实验，滤膜孔侵袭实验	见图22.8和图22.9（Marreel et al.，1979；Brunton et al.，1997）


彩版24


彩版15

22.1 在细胞系特征描述中的作用

确定一个细胞系是来自于赘生性细胞（neoplastic cell）还是在培养环境下发生了转化，考虑其转化特征尤为重要。如果培养的细胞来源于肿瘤组织，则一定要了解其转化情况，以便确定细胞是来自于肿瘤内的赘生性成分，而不是相应的正常细胞、浸润的成纤维细胞、血管壁的细胞或炎症细胞。

确定赘生的状态需要一个以上的标准，因为多数赘生性细胞的特征在正常细胞发育的特定阶段也会出现，反而在转化细胞并不一定都表达。但非整倍体、异倍体和致瘤性这几个指标不包括在内，它们已被公认为是恶性转化明确的阳性指标。但也有一些肿瘤细胞系染色体数目接近整倍体且不具有致瘤性，所以还需要其他的衡量标准。

随着基因分型（genotyping）成为常规程序，比较培养细胞与其来源的肿瘤细胞的基因型变得更加容易。这不仅可以帮助确认细胞系的来源，也可以显示与肿瘤发展进程相关的遗传异常是否存在于该细胞系中。由于很可能存在多个异常，肿瘤可能由多个亚克隆组成，鉴于建立细胞系时筛选程序的限制，肿瘤中所有的异常性状并不一定都能在细胞系中体现。但是，将来这个鉴定细胞系是否来源于肿瘤的方法，会被后续描述更多、更方便的方法取代。

22.2 遗传不稳定性和异质性

22.2.1 遗传不稳定性

细胞系的特征并不总能保持稳定。除了前面已提到过的表型改变外（参见 2.4.2 节、19.1.1 节），细胞系还容易出现遗传不稳定性（Wenger et al.，2004）。正常的人有限细胞系通常有较好的遗传稳定性，但是来源于其他种属的尤其是小鼠的细胞系，常会出现遗传不稳定，容易发生转化。连续细胞系，特别是来自各个种属的肿瘤细胞系，遗传非常不稳定。这并不奇怪，正是这种不稳定性使细胞系出现了必要的突变而变成了连续型，DNA 监控基因（如 *p53*）的改变或缺失，常涉及其中。连续细胞系通常是异倍体的，也就是说整个细胞群中的细胞染色体数目变化范围非常宽（参见图 2.11b），这意味着真正的遗传多样性。连续细胞系被克隆后，形态的多样性也是异质性的证据之一（参见彩版 7）。另外，在 WIL 肺腺癌细胞系中也能见到异质性的证据，即 CEA 染色后，一部分细胞呈阳性，而另一部分则呈阴性（参见彩版 12a）；其他异质性的证据还有 H4-II-E-C3 最小变异肝癌的几个亚克隆（Pitot et al.，1964），它们的构成不同，酪氨酸转氨酶的糖皮质激素诱导水平也不相同（图 22.1）。连续细胞株即使在克隆后，仍拥有多种的基因型，且可以不断发生改变。


彩版 7


彩版 12

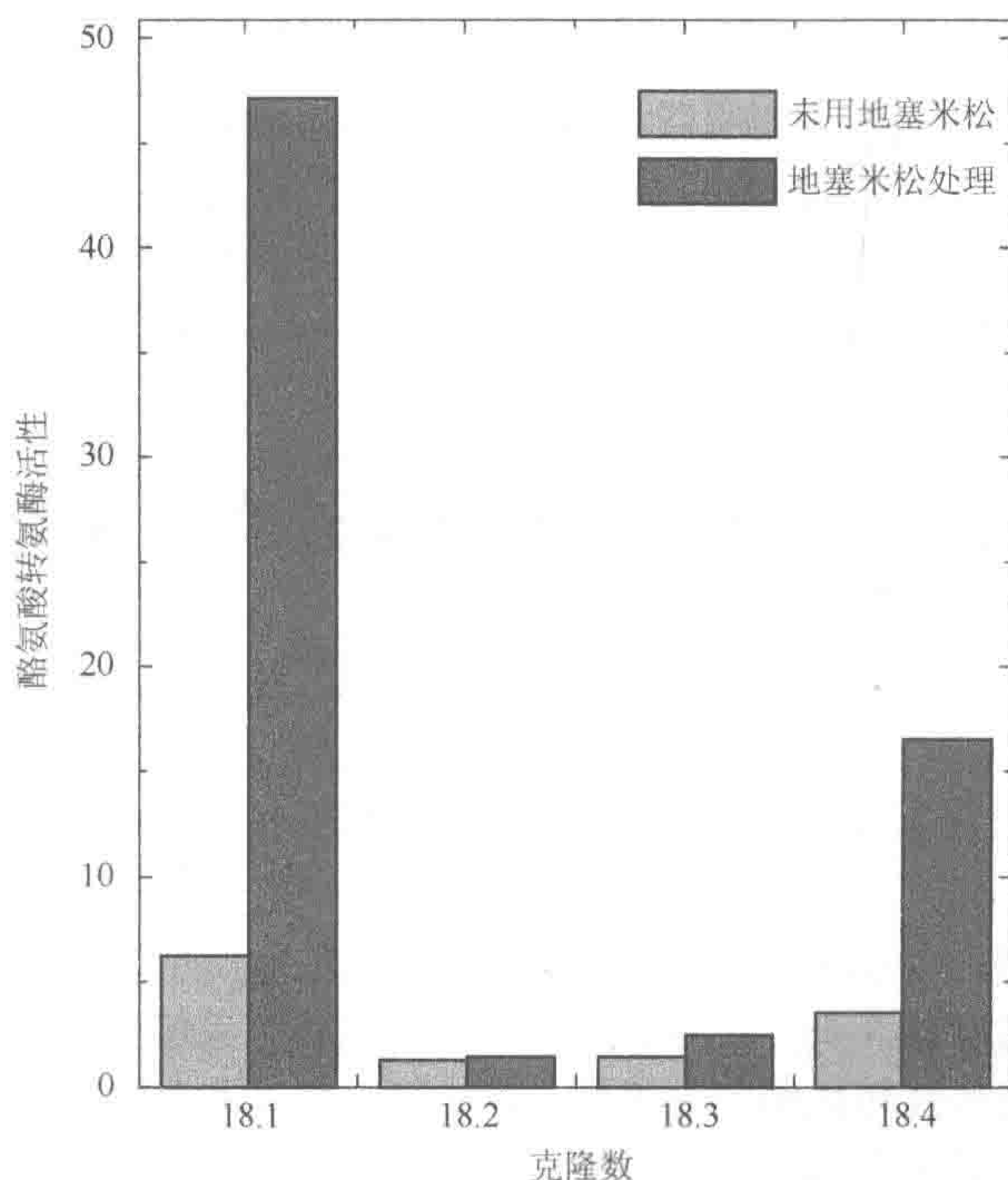


图 22.1 克隆的差异。大鼠最小变异肝癌细胞株 H-4-II-E-C3 的 18 号克隆的 4 个亚克隆的酪氨酸转氨酶活性的差异。细胞克隆后，分离出 18 号克隆，使之生长，然后再克隆；第二代克隆用或不用地塞米松处理，然后做酪氨酸转氨酶的活性分析。浅灰色柱代表基本水平；深灰色柱代表诱导水平（数据来自 J. Somerville）

引起遗传异质性有两个主要的原因：①体外的自发突变率较高，这可能与细胞的高增殖率和 DNA 监控基因尤其是 *p53* 缺失相关；②突变细胞除非生长能力受损，否则不会消失。

22.2.2　染色体畸变

在进行染色体计数（参见图 2.11）和核型分析时常可以发现遗传重排的证据。虽然小鼠的核型是独特的小的端着丝粒染色体，但由于端粒的罗伯逊融合，许多小鼠连续细胞系会出现数个中间着丝粒染色体（图 22.2a）。虽然动物体内每个正常的细胞都应该是二倍体，但在培养时容易发生改变。在一些特殊的例子中，如连续细胞株 HeLa-S_3，拥有相同核型的细胞还不到总数的一半，即它们是异倍体（图 2.11）。

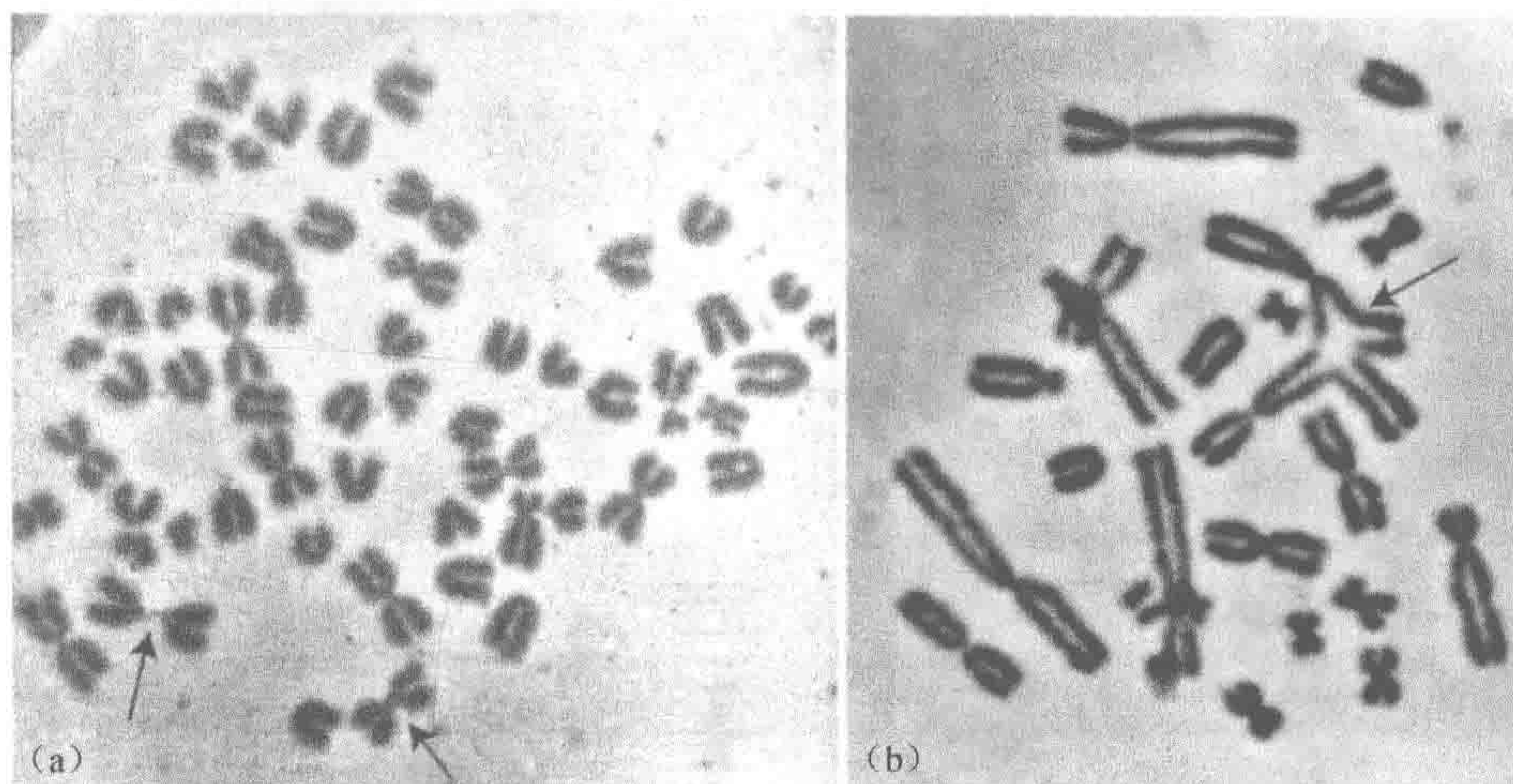


图 22.2　染色体畸变。异常重组示例。（a）P2 细胞，L929 小鼠成纤维细胞的一个克隆，显示多个端粒融合，其中两个用箭头标注；（b）Y5 中国仓鼠细胞大群中两个不相似的染色体间的重组事件。这个细胞将无法存活

染色体倍数的改变和单个染色体畸变频率的增加（图 22.2b）都可以被检测出来（Biedler，1976；Croce，1991），在多数肿瘤细胞培养中常见的染色体数目的变化（参见图 2.11，方案 13.4）（Murnane，2006；Macleod et al.，2011），可在用流式细胞仪检测时显示 DNA 的含量异常。遗传不稳定性的发生率和染色体重排的频率可用姐妹染色单体互换实验检测（Bryant，2004）（见方案 24.5，彩版 17e、f）。



彩版 17

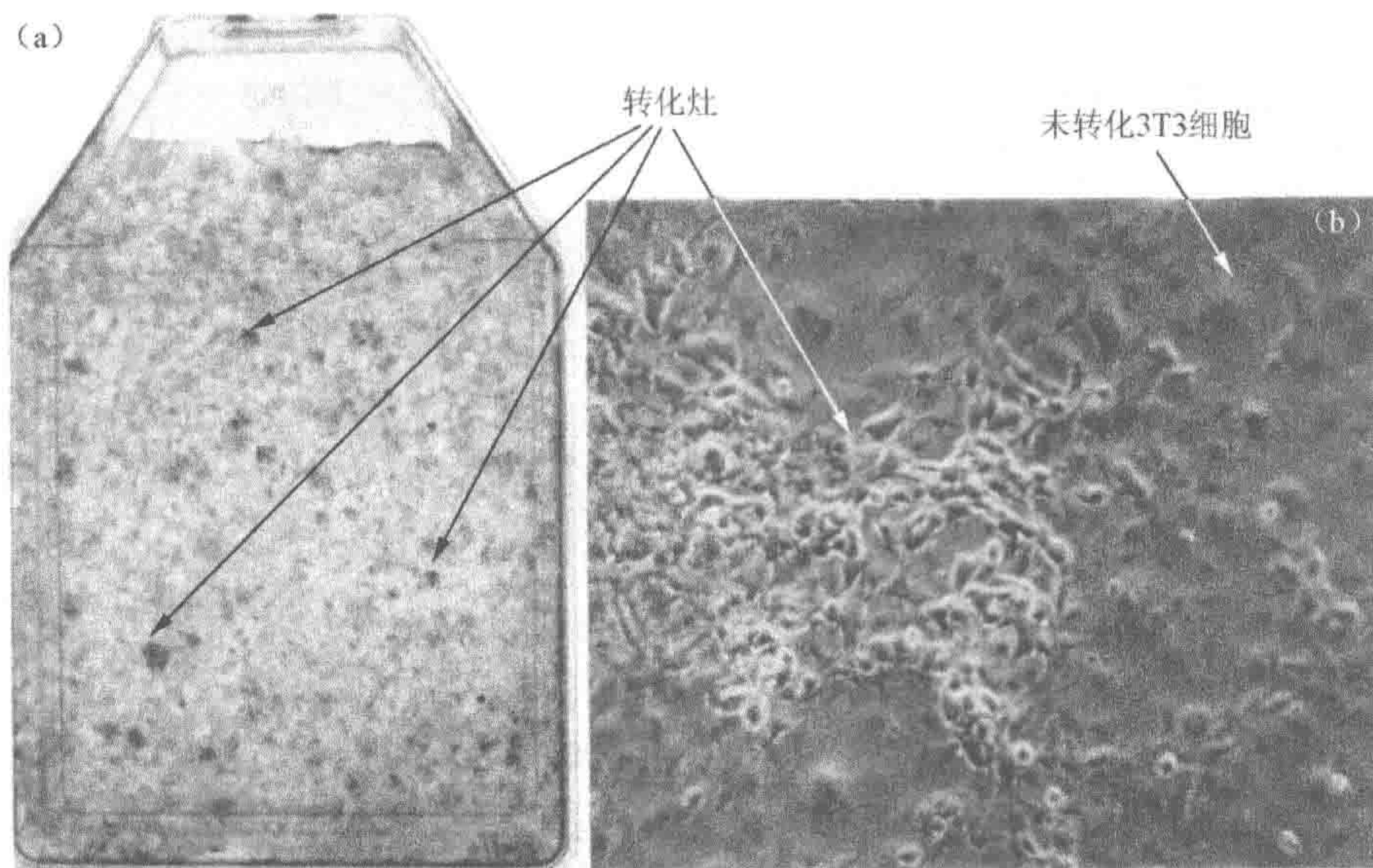
多数肿瘤培养时呈现非整倍体，即不再是正常的染色体数目。一些特殊的畸变与特定类型的恶性肿瘤相关（Ganmore et al.，2009）。最先有文献记载的是慢性髓细胞性白血病中的费城染色体，现在知道是 9 号和 22 号染色体之间相互易位造成的（Nowell and Hungerford，1960）。随后在 Burkitt's 淋巴瘤中发现了 8 号和 14 号染色体长臂的易位（Lebeau and Rowley，1984）。其他一些白血病也有易位现象（Mark，1971）。硬脑（脊）膜肉瘤常有特定的畸变（Yew et al.，2013），小细胞肺癌常有染色体 3p2 缺失（Wurster-Hill et al.，1984）。这些畸变构成了肿瘤的特异标记物，在肿瘤细胞系的鉴定和确认其赘生性方面具有重要价值（Mitelman et al.，2009）。

22.3　永　生　化

多数正常细胞的寿命是有限的，能传 20~100 代（参见 2.7.4 节），但有些细胞，尤其是来自啮齿类或来自多数肿瘤的细胞，可以产生具有无限寿命的连续细胞系。啮齿类动物细胞在分离时核型是正常的，在传到 12 代左右以后可能出现危机期，多数细胞在这个阶段死亡了，但少数细

胞存活下来，并拥有了更高的生长率，成为连续细胞系。

来自小鼠胚胎的连续细胞系（如多种3T3细胞系），如果让其维持低细胞密度，而且不允许细胞汇合，则细胞可保持接触抑制和生长密度限制的敏感性（Todaro and Green，1963）。但是如果允许细胞汇合并维持一段较长的时间，则会出现细胞灶，该处细胞的接触抑制性降低，开始重叠，最终过度生长（图22.3）。




彩版14

图22.3 转化灶。单层正常的具接触抑制的NIH 3T3小鼠成纤维细胞汇合后维持2周。(a) 75cm^{2}培养瓶，Giemsa染色；(b) 相差显微镜下在单层细胞上过度生长的转化灶（10×目镜）（另见彩版14c）

这些细胞在低密度或刚汇合时并无特别表现的事实提示它们是在进一步的转化事件后新形成的。它们具有生长优势，随后的传代中由于细胞随意生长而迅速生长过度。这种细胞类型常具有致瘤性，丧失了作为饲养细胞的价值（Edington et al.，2004）

22.3.1 衰老的控制

培养细胞的有限寿命是由10个或更多的起显性作用的一组衰老基因调控的，其产物在细胞周期的进程中起负调控作用（Goldstein et al.，1989；Sasaki et al.，1996）。有限细胞系和永生化细胞系之间进行体细胞杂交，其后代常只具有有限的生命，提示衰老基因是显性的（Pereira-Smith and Smith，1988；Nishizuka et al.，2001；Backsch et al.，2001）。这些基因中的一个或多个可能对端粒酶的表达起负调控作用（Holt et al.，1996；Greider and Blackburn，1996；Smith and de Lange，1997；Bryan and Reddel，1997），端粒酶在端粒DNA的末端合成中发挥作用，没有此酶则端粒DNA在细胞有限的生命中逐渐变短，直到染色体DNA不能再复制。端粒酶在生殖细胞中表达，在干细胞中活性中等，但在体细胞中该酶不表达。衰老基因的缺失和（或）突变，或者一个或更多癌基因过度表达或突变，其作用超过了衰老基因的作用时，可使细胞脱离细胞周期的负调控，重新表达端粒酶。

目前认为永生化是一个多步骤的过程，包括一系列细胞周期的调节基因（如*Rb*和*p53*）失活。*SV40LT*基因常用于诱导永生化。这个基因的产物——T抗原，可与*Rb*和*p53*结合。这样不仅使细胞增殖的寿命得以延长，同时也限制了如*p53*基因的DNA监控活性，从而使基因组的不

稳定性增加，也增加了向永生化发展所需要的进一步突变的机会（如上调端粒酶或下调端粒酶抑制物的活性）。用端粒酶基因（含可调节启动子）进行转染足以形成永生化细胞（Bodnar et al.，1998；Vaziri and Benchimol，1998）。

永生化本身并不意味着会发展成生长控制异常和恶性化，许多永生化细胞系，如 3T3 细胞和 BHK21-C13，它们仍保留着细胞的接触抑制性、细胞增殖的密度限制和停泊依赖性，且不致瘤。但是细胞生长控制的某些方面一定出现了异常，基因组的不稳定性因此有所增加。此外，永生化细胞系常丧失分化能力。但有报道显示，端粒酶诱导永生化的角质形成细胞（Dickson et al.，2000）和骨骼肌卫星细胞（Wootton el al.，2003），*p53* 活性并未消失，且保留了分化能力。比较用 SV40 T 抗原及用端粒酶（hTERT）分别诱导致永生化的人乳腺细胞，结果显示用 hTERT 致永生化的细胞基因型更稳定，且有更好的分化能力（Toouli et al.，2002）。

22.3.2　病毒基因致永生化

许多病毒基因已被用于细胞永生化（表 22.2）。人们早已知道 SV40 可用于制备永生化细胞，大 T 基因（*LT*）很可能在其中发挥重要作用（Mayne et al.，1996）（参见方案 22.1）。其他用于诱导永生化的病毒基因有腺病毒 *E1a*（Seigel，1996）、人乳头瘤病毒（HPV）*E6* 和 *E7*（Peters et al.，1996；Le Poole et al.，1997），还有 Epstein-Barr 病毒（EBV；常使用整个病毒）（Bolton and Spurr，1996）。这些基因多数是通过抑制如 *CIP-1* / *WAF-1* / *p21*、*Rb*、*p53* 和 *p16* 等基因的活性，来阻断它们对细胞周期进程的抑制性从而发挥作用的，这样增加了细胞寿命，削弱了 DNA 监控，

表 22.2　用于永生化的基因

基因	插入	细胞类型	参考文献
EBV: *ebna*, *Imp1*	感染	B 淋巴细胞	Bolton and Spurr，1996；Bourillot et al.，1998；Sugimoto et al.，2004
SV40LT	脂质转染	角质形成细胞	Steinberg，1996
	磷酸钙转染	成纤维细胞	Mayne et al.，1996
	磷酸钙转染	星形胶质细胞	Burke et al.，1996
	腺病毒感染	食管上皮	Inokuchi et al.，1995
	微注射	大鼠脑内皮	Lechardeur et al.，1995
	转染	前列腺上皮	Rundlett et al.，1992
	转染	乳腺上皮	Shay et al.，1993
	磷酸锶转染	支气管上皮	De Silva et al.，1996
	磷酸锶转染	间皮细胞	Duncan et al.，1996
HPV 16 E6 /E7	反转录病毒转移	宫颈上皮	Demers et al.，1994
	转染	角质形成细胞	Bryan et al.，1995
	磷酸锶转染	间皮细胞	De Silva et al.，1994
	磷酸锶转染	支气管上皮	De Silva et al.，1994
	反转录病毒感染	卵巢表面上皮	Tsao et al.，1995
Ad5 E1a		上皮细胞	Douglas and Quinlan，1994
htrt	转染	视网膜色素上皮	Bodnar et al.，1998
	转染	包皮成纤维细胞	Bodnar et al.，1998
	转导	骨髓干细胞	Simonsen et al.，2001
	转导	角质形成细胞	Dickson et al.，2000
	转导	成肌细胞	Wootton et al.，2003

增加了进一步突变的机会。这些基因中已被广泛应用的有：*EBV* 用于成淋巴细胞样细胞（Bolton and Spurr, 1996）；*SV40LT* 用于黏附细胞，如成纤维细胞（Mayne et al.，1996）、角质形成细胞（Steinberg，1996）和内皮细胞（Punchard et al.，1996）等；而 *hTERT* 则用于间充质干细胞（参见方案 22.2）和其他一些细胞。

通常细胞要在未衰老之前用永生化基因转染或反转录病毒感染。这将使细胞的增殖寿命再增加 20~30 群体倍增次数，此后细胞停止增殖，进入危机期。度过长短不等的危机期后（有的可长达数月），一些永生化的细胞过度生长，最终能达到永生化的细胞比例为 1×10^{-9}~1×10^{-5}。

短篇综述 22.1　衰老与永生化*

引言 人的体细胞只能分裂有限的次数，之后就进入一个称为衰老的阶段，该阶段的特点为细胞永远离开分裂周期和发生形态改变（Campisi，2013）（图 22.4）。相比之下，一个物种的长时间生存依赖于其功能上永生的生殖细胞。

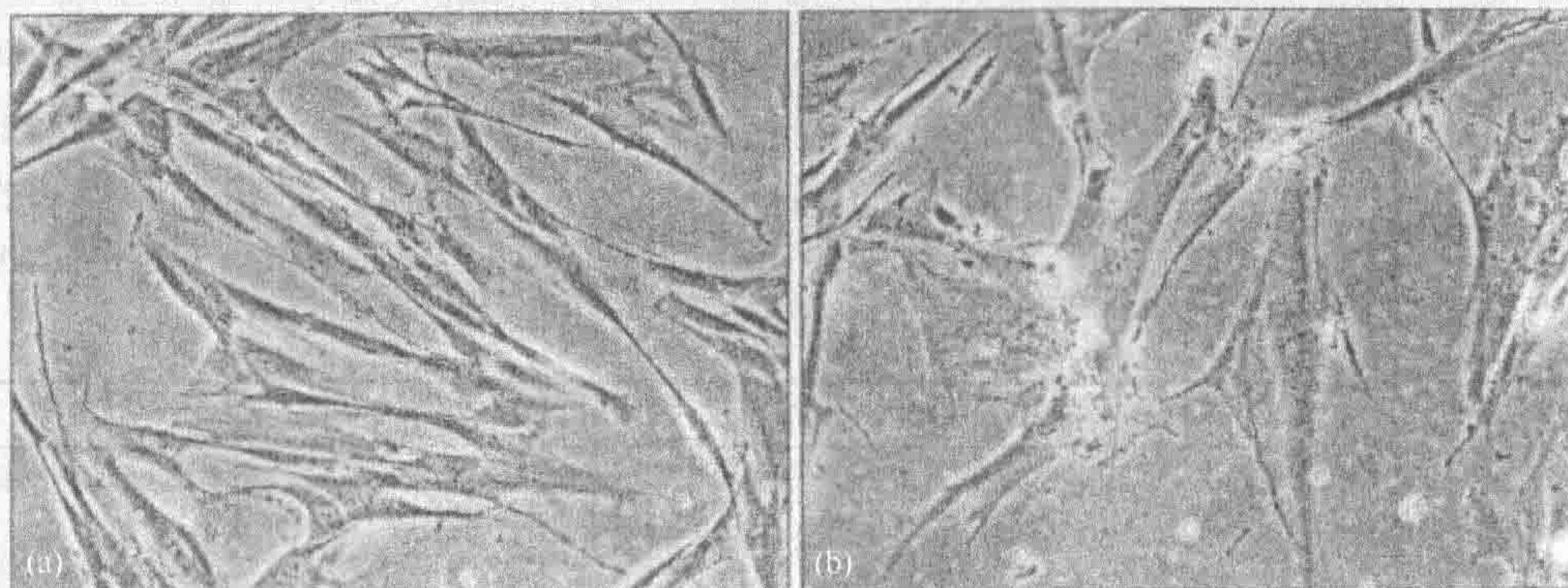


图 22.4　衰老的形态学改变。年轻的（a）和衰老（b）的成纤维细胞。相差显微镜，20×物镜（来自 Wei-Qin jiang and Roger Reddel）

细胞衰老发生在正常的胚胎发育中，也发生于老化（aging）过程中。它的发生还可能是多种环境因素和治疗药物（如细胞毒性癌症化疗药物）作用的结果。现今多数关于衰老的研究，其动机是为了深入地了解老化或为治疗癌症服务（Nardella et al.，2011），因为：①几乎所有人类癌症都含有成为永生化的细胞群，所以了解它是如何发生的也许会为进一步治疗确立新的靶标（Reddel，2000）；②大量的生物医疗研究需要依赖体外细胞培养模型，如果培养的细胞不会衰老，不仅非常方便，有时甚至是必需的。

衰老和永生化的机制 正常体细胞的增殖能力是有限的，因为其染色体末端（即端粒）不断变短，这在每一个细胞分裂周期都会发生（图 22.5）。当它们的端粒足够短时，细胞进入衰老阶段（Allsopp et al.，1992）。包括特殊化合物和来自癌基因的过量信号在内的其他刺激，也可以引起衰老。如果 p53 和 pRB/p16INK4a 肿瘤抑制通路失活，细胞可绕过衰老。细胞将继续分裂，直到它们的端粒过短，以至丧失防止染色体末端与末端融合的能力，导致基因组不稳定和细胞死亡（即培养危机期）。细胞中的一小部分通过自发的遗传改变，激活了端粒延长机制（telomere lengthening mechanism，TLM）

---

* 来自 R. R. Reddel, Cancer Resarch Unit, Children's Medical Research Insitute, University of Sydney, Westmead, NSW 2145, Austrilia RRedded@cmri.org.au。

进入永生化。2个已知的TLM是端粒酶激活和端粒选择性延长（alternative lengthening of telomeres，ALT）。端粒酶是一个可以从头合成端粒序列的反转录酶复合物，含有多个亚单位，包括一个反转录酶蛋白（hTERT）和一个RNA（hTR），其中RNA含有用于反转录端粒重复序列5′-TTAGGG-3′的模板区（Blackburn，2005）。ALT是一重组-介导DNA复制过程，利用其他端粒DNA作为复制模板来合成新的端粒DNA，以此延长端粒（Cesare and Reddel，2010）。

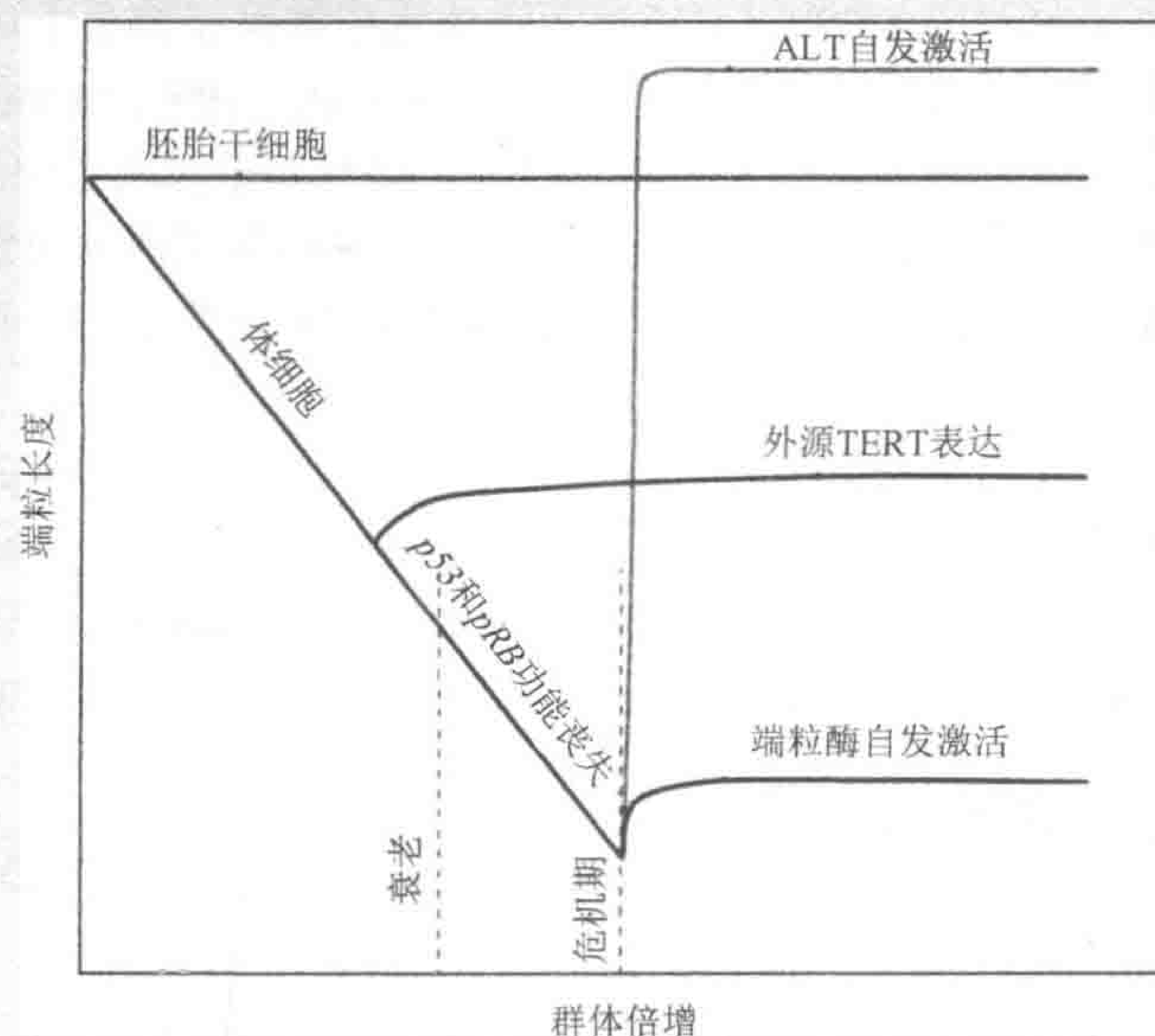


图22.5 端粒长度。下列细胞的端粒长度与增殖功能（以群体倍增次数表示）的关系，如胚胎干细胞（永生化的），逐渐衰老的正常体细胞（非永生化的）。当体细胞丧失*p53*和*pRB*抑癌基因功能进入培养危机期后，通过自发激活端粒酶或ALT，或通过表达外源的TERT激活端粒酶，细胞最终达到永生

获得衰老培养细胞的方法 理论上，获得衰老培养细胞最简单的流程是：正常有限细胞系重复传代，直到它们衰老。但实践起来较困难，因为时间的限制，也因为细胞很难同时到达增殖极限。所以通过过表达癌基因（如突变*HRAS*）会更快、更同步地诱导衰老（Serrano et al., 1997）。

获得永生化培养细胞的方法如下。

（1）癌细胞系。从癌症标本建立永生化培养（即一个连续细胞系）通常是可行的，虽然一些种类的癌细胞（如小细胞肺癌）比另外一些（如前列腺癌）更容易建立永生化培养。也许是因为所提供的培养条件对一些细胞更适用。许多癌细胞系可从国际细胞资源库获得（参见表15.5）。

（2）胚胎干细胞。人胚胎干细胞（human embryonic stem cell，hESC）是多潜能的，来自5~7日胚泡的内细胞群（参见方案26.3-Su）具有形成连续细胞系的能力（Hasegawa et al., 2010）。在一些地区建立hESC细胞系需要执照（参见6.9.2节）。已建成的hESC细胞系可从细胞资源库获得。

（3）诱导的多能干细胞。诱导的多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPSC）来自成人细胞，通过操纵多个基因表达（如*Oct-3/4*、*Glis1*、*Sox2*、*Klf4*）或额外的药物作用（如ALK5和MEK抑制物），使成人细胞重编程，成为ESC-样状态。iPSC细胞系可分化成多种正常的细胞类型，但如果不允许其分化，则可以一直增殖。

（4）病毒癌基因。获得永生化细胞的传统技术是采用病毒癌基因。这些方法依然用于从特殊细胞类型获得细胞系，以及研究包括永生化过程在内的遗传事件。EBV病毒感染的血液样本，由于产生成淋巴细胞样细胞系（lymphoblastoid cell line, LCL），可以为遗传研究提供无限的DNA来源。由于端粒酶被不明机制激活，感染后的细胞将群体倍增45~160次。除此以外，

永生化可通过一些癌基因，如 *SV40* 早期区域，人乳头瘤病毒（HPV，特别是 HPV-16）的 *E6*、*E7* 基因等获得。这些癌蛋白通过抑制 *p53* 和 *pRB* 的功能绕过衰老，允许细胞继续增殖直到培养危机期。极少量细胞自发地激活 TLM 摆脱培养危机期、得到永生。SV40 可通过激活 ALT 或端粒酶转化成纤维细胞，而 SV40 转化上皮细胞、HPV 转化细胞多通过激活端粒酶。

（5）TERT 转导。人细胞的端粒酶激活，可通过表达编码 hTERT（端粒酶的催化亚基）的构建体诱导完成（Bodnar et al.，1998）。与通过表达病毒癌基因获得永生化的细胞相比，以此方法获得永生化的细胞保持更多正常细胞的特征（Jiang et al.，1999；Toouli et al.，2002）。

结论 关于衰老和永生的进一步分子生物学研究，将有助于深入了解老化和癌症。iPS 的产生和诱导分化的技术进步将使获得足量的、多种正常的细胞类型成为可能，以往用癌症细胞系和病毒永生化细胞系等作为替代品在体外研究正常细胞终将被取代。

22.3.3 人成纤维细胞的永生化

方案 22.1 成纤维细胞永生化*

背景

到目前为止，最成功和最常用的获得永生化人成纤维细胞的方法是通过表达 SV40 T 抗原来完成的，它并不直接导致永生化，而是启动了一系列反应，最终有很少一部分细胞出现了永生化，估计约为 $1/10^7$（Shay and Wright，1989；Huschtscha and Holliday，1983）。SV40 转染的细胞直接置于适当的培养条件下进行筛选，将存活的细胞再传代，以产生一个危机期前的 SV40 转化细胞群。继续培养这些细胞直到其到达增殖寿命的终点，它们不可避免地进入危机期。之后需要精心照顾，而且还需要培养足量的细胞，这样才有可能出现永生化细胞。

T 抗原表达载体的选择依赖于显性的选择性标记基因的选定，它是驱动 T 抗原表达的启动子的来源，也是 T 抗原的自身替代形式。根据我们的经验（Mayne et al.，1996），虽然对于人成纤维细胞用 *gpt* 筛选很有效，但用 G418（*neo*）和潮霉素（*hygB*）效率更高，也更容易使用。多数人 SV40-永生化的成纤维细胞系或者是用 SV40 病毒，或者是用其构建体（如 pSV3neo），从内源性启动子表达 T 抗原来建立的。我们推荐使用 pSV3neo 质粒（Sourthern and Berg，1982；Mayne et al.，1986）持续表达 T 抗原。

应选用传到 7~15 代的细胞。转染前 24~48h 用胰蛋白酶消化细胞，9cm 培养皿中接种（2~2.5）$\times10^5$ 个细胞，或 175cm^2 培养瓶中接种（5.5~6.8）$\times10^5$ 个细胞。转染时细胞应达到 70%~80%汇合，培养基的终体积应为：10mL/9cm 培养皿，或 30mL/175cm^2 培养瓶。

磷酸钙沉淀法是指在钙和磷酸根离子存在的条件下形成 DNA 沉淀。DNA 在乙醇沉淀时首次灭菌，然后重悬于无菌缓冲液中，小心地与钙混合，将该混合液非常缓慢地加入到磷酸盐溶液中并混匀。制备沉淀时要注意，沉淀中 DNA 的终浓度为 20μg/mL 时基因转移的效果最佳。加入到培养物中的 DNA 沉淀体积不能超过总体积的 1/10。加入到培养物之前，先让混合物放置 30min 是很有必要的。

* 摘编自 Mayne et al.，1996。

材料

无菌

- HEPES 缓冲液：HEPES，12.5mmol/L；pH 7.12
- 10×CaHEPES：$CaCl_2$，1.25mol/L；HEPES，125mmol/L；pH 7.12
- 2×HEPES 缓冲的磷酸盐缓冲液（2×HBP）：Na_2HPO_4，1.5mmol/L；NaCl，280mmol/L；HEPES，25mmol/L；pH 7.12
- NaOAc：NaOAc，3mol/L；pH 5.5
- Tris-缓冲的 EDTA（TBE）：Tris·HCl，2mmol/L；EDTA，0.1mmol/L；pH 7.12
- 无水乙醇
- Eagle's MEM/15% FCS
- G418（Invitrogen）：20mg/mL 溶于 HEPES 缓冲液，pH 7.5，0.2μm 滤膜过滤除菌，少量分装，–20℃保存
- 潮霉素（Roche Applied Science）：2mg/mL 溶于 UPW，0.2μm 滤膜过滤除菌，少量分装，–20℃保存
- SV40 T 抗原 DNA

操作步骤

1. 估计转染所需的 DNA 量
   （a）T 抗原载体（不含载体 DNA）每培养皿最多 20μg；每培养瓶中最多 60μg。
   （b）要多制备 20μg DNA，因为沉淀制备过程中沉淀常无法全部回收，难以达到预期值。
2. 在微型离心管中准备含载体 DNA 的无菌溶液
   （a）用 1/10 体积的 3.0mol/L NaOAc，pH 5.5 和 2.5 倍体积的乙醇沉淀 DNA。
   （b）混匀，确保整个管的内壁都接触过乙醇。
   （c）冰上短暂静置（约 5min）。
   （d）15 000 r/min 离心 15min，收集沉淀。
   （e）从离心机中轻轻取出离心管，在层流通风橱中打开离心管管盖。
   （f）吸出上清液，注意不要碰到沉淀，确保乙醇被吸净。
   （g）在超净台中干燥沉淀，直到痕量乙醇蒸发。
   （h）用 TBE 重悬 DNA 沉淀，使终浓度为 0.5mg/mL。使用振荡器使沉淀从管壁脱离。
   （i）37℃孵育 5~10min，偶尔振荡一下，确保沉淀很好地重悬。

注意事项 不要用高浓度 TBE 重悬 DNA 沉淀，因为这样会干扰 DNA 沉淀的形成。

3. 准备 DNA 磷酸钙沉淀
   （a）计算沉淀需要的总体积。沉淀中 DNA 的终浓度应为 20μg/mL，每个 9cm 培养皿需要 1mL 溶液，每个 175cm^2 培养瓶需要 3mL。记住多准备 1mL 沉淀，以便补充沉淀过程中的液体损失，保证有足量液体加入到培养物中。
   （b）用 12.5mmol/L HEPES 稀释 DNA/TBE 混合物，使终浓度为 20μg/mL。
   （c）加入最终混合物体积 1/10 的 10×$CaCl_2$。
   （d）往等量的 2×HBP 溶液中逐滴加入混合液，边滴加边混合。例如，9 个 9cm 培养皿，每个培

养皿需 1mL，再多加上 1mL，即共需 10mL 混合液，则

（i）DNA/TBE，0.5mL

（ii）12.5mmol/L HEPES，3.5mL

（iii）10×$CaCl_2$，1.0mL

（iv）逐滴加入到 2×HBP，5.0mL

（v）混合物的终浓度如下：

DNA	20μg/mL
$CaCl_2$	0.125mol/L
Na_3PO_4	0.75mmol/L
NaCl	140mmol/L
HEPES	12.5mmol/L
pH 7.12	

注意事项 制备 DNA 磷酸钙沉淀时请选用塑料移液管和试管，因为沉淀会牢固地黏附在玻璃上。混合时，推荐使用两把手动移液管控制器和两个移液管，一个用于向混合液中吹入无菌空气，另一个用于小心地将 DNA/钙混合物逐滴加入到磷酸盐溶液中，混合得好则沉淀均匀。根据要制备的沉淀体积选用 1~5mL 移液管。当 DNA/钙溶液加入磷酸盐溶液后，少量、均匀的沉淀开始形成。沉淀非常明显，沉淀完全后液体呈乳白色。

（e）当 DNA/钙溶液完全加入到磷酸盐溶液后，盖上管盖，轻柔地颠倒混匀 1~2 次，室温直立静置 30min。

（f）制备一个不含 DNA 的模拟沉淀（空载体系），以便评估筛选条件是否有效。空载体系的制备与常规沉淀制备相同，但用 HEPES 缓冲液替代 DNA。

4. 加入 DNA 沉淀或空载体系：每培养皿 1mL 或每培养瓶 3mL。确保沉淀的体积不超过细胞培养基总体积的 1/10。

5. 让沉淀在细胞上至少作用 6h，但不要过夜（约 16h）。因为暴露在钙和磷酸盐环境下超过 6h，会对来自某些个体的成纤维细胞产生毒性。

6. 吸掉磷酸钙沉淀。无需进一步清洗细胞，或根据我们的经验，用 DMSO 或甘油进一步处理细胞。

7. 加入培养基，孵育 48h（从实验开始后计算），然后加入筛选试剂。试剂是根据转染时选用的载体而定的。携带 *neo* 基因的载体对 G418（遗传霉素）有抗性，携带 *hyg b* 基因的载体对潮霉素 B 有抗性。根据我们的经验，100~200μg/mL G418，或 10~20μg/mL 潮霉素 B 可使成纤维细胞在一周内逐渐死亡。

8. 更换转染培养皿中的培养基

（a）加所需体积的培养基于适当大小的无菌培养瓶中，加入储存浓度的 G418 或潮霉素 B，使达到合适的终浓度。

（b）轻柔地混匀溶液。

（c）将培养皿或培养瓶中的培养基吸出，用选择培养基替代。

（d）将培养皿或培养瓶重新放回孵箱。

9. 每日用显微镜观察培养物，以检查选择培养基的效果。当大量细胞漂起、死亡时，更换新的选择培养基。保证选择持续整个过程。

10. 继续更换培养基，直到背景细胞漂起、死亡。在对照的模拟转染的培养皿中因为没有 DNA 转染，7~10 天后应该无细胞存活。如果仍有细胞存活，则选择系统条件不够充分，可能需要提高筛选试剂的浓度。

11. 一旦背景细胞死亡，就不再需要常规性更换培养基了。细胞要在孵箱中安静培养 4~6 周，以便转染细胞生长并形成克隆。

12. 一旦克隆形成，用克隆环挑选单个克隆（参见方案16.6），或用胰蛋白酶消化整个培养皿或培养瓶，把克隆收集到一起。

13. 尽早开始小份冻存细胞，并使冻存常规化。一旦转染物增加到可以进行培养了，就将其中一部分用液氮冻存保留。在细胞进入危机期前的整个阶段都有冻存细胞的必要。为尽量减少真菌的污染，加入两性霉素 B 2.5μg/mL。

14. 常规传代，直到细胞达到体外培养的寿命极限。当细胞接近危机期时，其生长率经常减缓。当细胞开始退化、细胞分裂停止时，就不需要再传代了。但是，如果大量细胞碎片黏附到活细胞上，可适当地消化以去除细胞碎片。细胞或者装回原容器，或者由于之前细胞大量死亡而换用更小的容器。一般情况下，细胞数量不能太过稀少，否则将不利于细胞的存活与生长。只要足够耐心、细心，从冻存细胞培养足量的细胞，多数情况可得到度过危机期的细胞系。

15. 当健康细胞开始出现，最好等到克隆生长到适当大小后再传代。不要让大培养瓶中的细胞数量过少。

16. 尽早开始冻存一管细胞，培养开始前持续进行，建立起一冻存细胞储备库。

17. 检查危机期后的细胞系是否真正永生化，推荐从培养物中选择和扩增单个克隆。这个方法的另外一个好处是能得到来自同一细胞的同源培养物。

转染后的精心培养

（1）筛选试剂的剂量要选择能使细胞在一周内缓慢死亡的剂量。DNA 处理培养板中的大部分细胞应在 7 天内逐渐死亡，剩余的是转染成功的细胞。

（2）建议常规性冻存一部分细胞，一方面，建立起一转染细胞的储备库；另一方面，如果由于污染使培养细胞丢失时，可有效节省时间。

（3）多数情况下，危机期是个很明显的事件。培养的大部分细胞出现退化迹象，活细胞的数量明显减少。危机期平均持续 3~6 个月，最终只有很少的、明显健康的细胞存活。

（4）一旦培养细胞进入危机期，则能可靠地预测出同批的、冻存在液氮中的细胞进入危机期的时间。该预测可使人们从冻存的平行培养的细胞库中获得相应的细胞，从而培养出若干瓶处于危机期临界值的细胞。当这些平行培养细胞进入危机期，开始丧失活力时，将这些培养瓶合并。有时，培养瓶中有足量的细胞，也有很多细胞碎片。这种情况下，需要进行处理。将细胞消化下来，离心、沉淀，再放回原瓶培养。在此之前，要用胰蛋白酶润洗原瓶多次，消除附着在瓶壁上的细胞碎片。

（5）细胞度过危机期的最早迹象是出现了一个或多个细胞灶，细胞明显强壮、健康，具有 SV40 转化细胞的典型特征。通过传代，这些细胞灶扩展形成健康的新一代培养细胞。多数情况下，最早出现的危机期后的细胞生长情况较差，进一步传代后生长状况好转，亚克隆能帮助筛选出生长较好的克隆个体。尽早冻存一份新获得的细胞系是非常重要的。我们常将细胞系在转化后经过 100 次以上的群体倍增，且有存活的亚克隆后代称为永生化细胞系。

（6）从这些培养细胞中得到永生系是相当稀少的事件，所以出现任何危机期后的细胞系都要经过检查，确保细胞是由最初的细胞转化来的，而不是实验室其他永生化细胞系交叉污染的结果（参见 13.1 节，短篇综述 13.1）。

22.3.4 端粒酶诱导的永生化

方案 22.2 用端粒酶诱导人干细胞和原代培养细胞永生化*

背景

端粒在染色体的稳定和决定细胞寿命方面起重要作用。端粒酶或末端转移酶是核糖核蛋白（RNP）复合物，在组织祖细胞和癌细胞中合成端粒重复序列。活化的人端粒酶由 3 个基本亚单位组成：RNA 组分（hTR）、蛋白催化亚单位（hTERT）和角化不良蛋白（dyskerin，DKC1）。目前证实还存在一个全酶亚单位——TCAB1（端粒酶 Cajal 小体蛋白 1），在 Cajal 小体中含量丰富，它是 RNP 加工的核位点，对端粒酶的功能发挥非常重要，因为它可以调节端粒酶的运输，在人癌症细胞的端粒合成中发挥作用（Venteicher et al.，2009）。RNA 亚单位在正常组织和恶性组织中广泛表达，而 hTERT 只在肿瘤组织、生殖细胞和激活的淋巴细胞中表达。衰老的根本原因可能是端粒的缩短，随之端粒融合，形成双着丝粒染色体，最后凋亡。用端粒酶基因 *htrt* 转染细胞后，细胞系的寿命延长，其中一部分永生化，但并未向恶性转化（Bodnar et al.，1998；Simonsen et al.，2002）（图 22.6）。由于 *htrt*⁺克隆中永生化的比例很高，该技术成为诱导永生化的一项很有前途的技术。虽然一些细胞系的功能还不明确，但该方法诱导永生的角质形成细胞（Dickson et al.，2000）和肌细胞（Wooton et al.，2003），其细胞分化未受干扰，这样的报道还是令人鼓舞的。

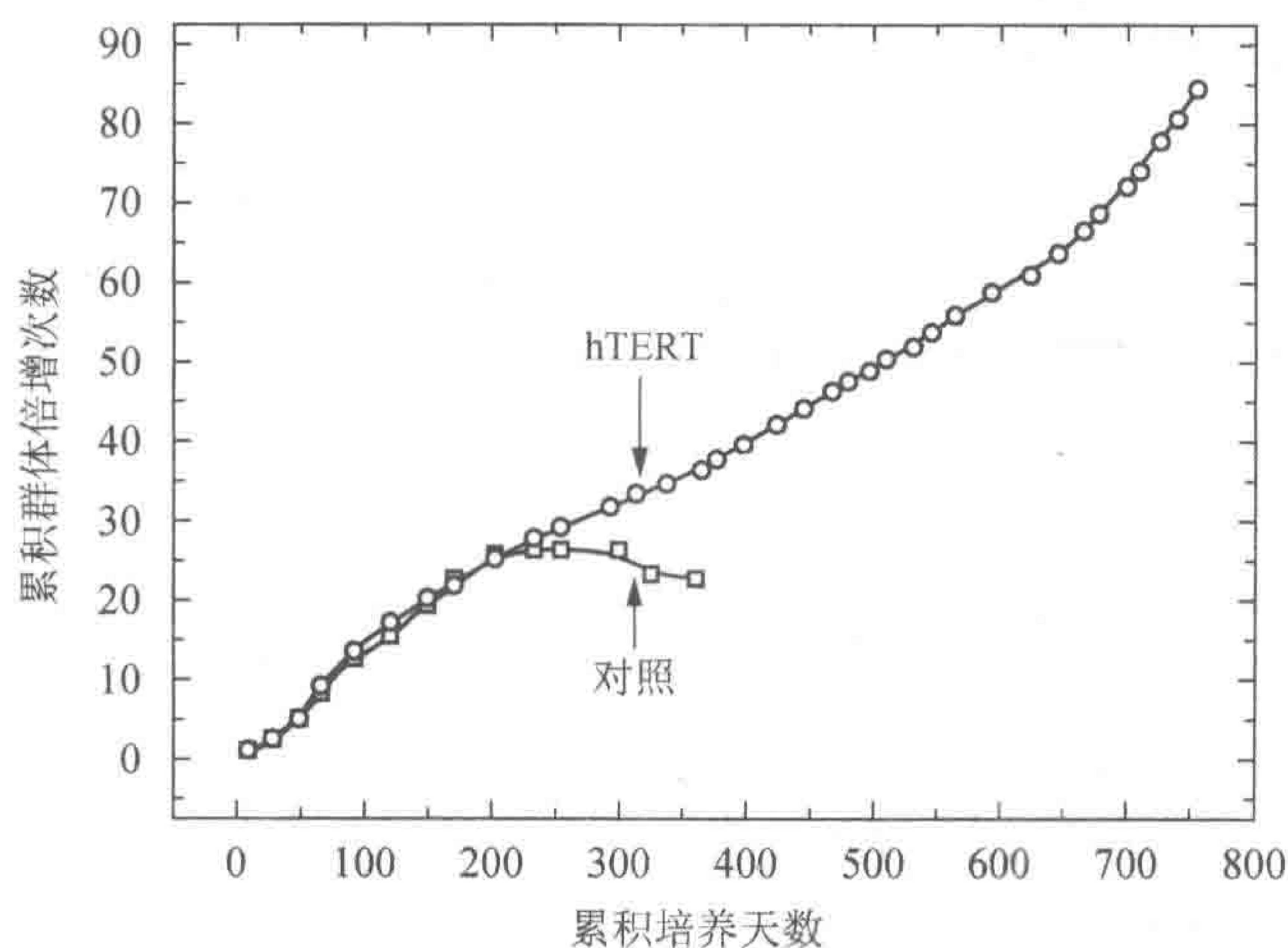


图 22.6 hTERT-永生化细胞累积的群体倍增（PD）次数。计算培养人间充质干细胞累积 PD（参见方案 22.2），根据培养的时间绘图，反转录病毒转导后异位表达 hTERT 的用圆圈表示，对照组（未转导）用方框表示（数据由 N. Serakinci 提供）

这个方案已成功地应用于多个人干细胞系和原代培养细胞（如间充质细胞、神经元细胞、肌卫星细

* 来自 Nedime Serakinci，Near East university，head of the Centre of Excellence，Genetics and Cancer Diagnosis- Research Centre，and Faculty of Medicine，Head of Departments of Medical Biology and Genetics，Near East Avenue，Nicosia，Northern Cyprus，99138。

胞、黑素细胞和肥大细胞）。

材料

无菌

- 用于人间充质干细胞和肥大细胞培养的生长培养基：Dullbecco' 改良 Eagle's 培养基（DMEM），含高浓度葡萄糖（4.5g/L）和 L-谷氨酰胺（2mmol/L），添加 10%小牛血清、100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素
- 人肌卫星细胞的培养基：Dullbecco' 改良 Eagle's 培养基（DMEM），含低浓度葡萄糖和 25mmol/L HEPES，添加 10%小牛血清，100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素，1× Glutamax 1（Life Technologies）
- 黑素细胞：黑素细胞完全培养基 M2（Promocell）
- 人脐带来源干细胞（hUCMSC）：DMEM-Ham's F12，含 10%胎牛血清
- 聚凝胺，8mg/mL（Sigma）
- 通用容器
- 培养瓶，25cm^2，75cm^2

反转录病毒载体的制备

- 细胞系

  PG13（Miller et al.，1991）

  GP+E-86（Markowitz et al.，1988a）

  AM12（Markowitz et al.，1988b）
- 反转录病毒载体，含（pBABE-嘌呤霉素，pBABE-puromycin）/ 不含选择性标记（GC Sam）
- 用于转染的 *htrt* DNA（Geron）
- Tx 缓冲液

HEPES，0.5mol/L，pH 7.1	200μL
NaCl，5mol/L	100μL
Na_2HPO_4/NaH_2PO_4，1mol/L	3μL
UPW	1.7mL
总量	2.0mL

- 缓冲液 A：

NaCl（5mol/L）	600μL
EDTA（0.5mol/L）	40μL
Tris-HCl pH 7.5（0.5mol/L）	400μL
UPW	19mL
总量	20.04mL

- $CaCl_2$，2.5mol/L

单层生长细胞的转导

hMSC 细胞，神经元干细胞，肌卫星细胞，黑素细胞，人脐带来源干细胞（hUC-MSC）

- 细胞
- 培养瓶：75cm^2
- 多孔培养板，6 孔

转导后

- 冷冻保存的材料（参见方案 15.1）
- 用于 DNA 图谱分析（参见方案 13.1）或其他鉴定程序（参见 13.1.4 节）的材料
- PCR 试剂
- DNA，100μg/mL
- 10×PCR 缓冲液（含 Mg）L（Qiagen）
- GC Sam TERT 的 ectoTERT 引物（正链：5′-GGACCATCTCTAGACTGACG-3′，反链：5′-GGAGCGCACGGCTCGGCAGC-3′，每种引物 2μmol/L，预期 PCR 产物大小为 100bp）
- pBABE-puro TERT 的 ectoTERT 引物（正链：5′- CCGCCTCAATCCTCCCTTTAT -3′，反链：5′-GGAGCGCACGGCTCGGCAGC -3′，每种引物 2μmol/L，预期 PCR 产物大小为 200bp）
- dNTP 混合物（10mmol/L）（Qiagen）
- DNA 聚合酶（Qiagen）
- UPW

操作步骤

A. 反转录病毒载体制备

1. 含 *hTERT* 基因的反转录病毒载体，用两步法包装入长臂猿白血病病毒（GALV）包装细胞系 PG13（Miller et al.，1991）。首先，用 20μg/mL *htrt* DNA（Geron）转染包装细胞系 GP+E-86（Markovitz et al.，1988a），然后用上清液感染 PG13 和（或）AM-12 细胞。

2. 在小培养瓶（$25cm^2$）中接种 $6.7×10^5$ GP+E-86 细胞。

3. 转染 GP+E-86 细胞。

4. 每管（通用容器）平均分配 280μL Tx 缓冲液

5. 用下表准备含 DNA 的试管（*X*×*Z*＝15μg）

名称	DNA 浓度	15μgDNA	缓冲液 A	$CaCl_2$，2.5mol/L	总量
	Z μg/μL	*X*μL	280-30-X	30μL	280μL

6. 将 Tx 缓冲液逐滴加入含 DNA 溶液的管中，轻柔混匀。

7. 室温孵育 30min，使沉淀形成。

8. 培养的 GP+E-86 细胞加入新鲜培养基，每 $25cm^2$ 培养瓶 5mL。

9. 向 GP+E-86 细胞上轻柔加入混合溶液（Tx+DNA），37℃孵育 4~6h。

10. 在 $25cm^2$ 培养瓶中仔细用 D-PBSA 洗细胞 3 遍。

11. 细胞上加入新鲜培养基，37℃孵育过夜。

12. 更换培养基，加 2mL 新鲜培养基（而不是 5mL），用于病毒产生。

13. 与步骤 3 同日进行，6 孔板中每孔接种 $1×10^4$ 个 PG13 细胞和（或）AM-12 细胞。

14. 次日，从转染的 GP+E-86 细胞收集上清液，加入聚凝胺，至终浓度 8μg/mL（即 1μL/mL 上清液）。

15. 上清液用 0.45μm 滤器过滤，往含二代包装细胞（如 PG13、AM-12 细胞）的培养孔中每孔加入 2mL 滤过液。

16. 培养板 32℃、1000*g* 离心。

17. 37℃ 孵育过夜。

18. 次日，更换培养基。

B. hMSC、神经元干细胞、肌卫星细胞或黑素细胞、脐带来源干细胞（hUC-MSC）的转导

1. 75cm^2 培养瓶中接种 2×10^6 转导的 PG13-pBABEpuro hTERT 或 AM12-pBABEpuro hTERT 或 PG13-GC-Sam TERT 或 AM12-GC-Sam TERT 细胞。

2. 次日，往包装细胞培养瓶中加入 6mL 新鲜培养基。

3. 下一日，将需要永生化的细胞（即 hMSC、神经干细胞、肌卫星细胞、黑素细胞、hUC-MSC）转入 6 孔板，浓度为（2.5~7.5）×10^4/mL。

4. 从包装细胞收集上清液，加聚凝胺到终浓度 8μg/mL，上清液用 0.45μm 滤器过滤。

5. 6 孔板中每孔加 2mL 滤过的反转录病毒上清液。

6. 离心培养板，32℃、1000*g*，37℃孵育过夜。

7. 去除反转录病毒上清液，给细胞加入新鲜培养基。

C. 悬浮细胞（如 hMSC）的转导

1. 75cm^2 培养瓶中接种 2×10^6 个转导的二代包装细胞。

2. 次日，往二代包装细胞培养瓶内加入 6mL 新鲜培养基。

3. 下一日，将要转导的肥大细胞转入 6 孔板，浓度为（7.5~10）×10^4/mL。

4. 从包装细胞收集上清液，加聚凝胺到终浓度 8μg/mL，上清液用 0.45μm 滤器过滤。

5. 6 孔板中每孔加入 1200μL 滤过的反转录病毒上清液。

6. 将培养板置于摇床/转动器上，以 100r/min 的速度摇动（使病毒与细胞在 37℃更好、更均匀地混合），孵育过夜。

7. 下一日离心培养板，32℃、1000*g* 离心 3min。

8. 去除反转录病毒上清液，根据细胞需要加入新鲜培养基。

D. hUC-MSC 转导（以 AM12-pBABEpuro hTERT 细胞为宜）

1. 75cm^2 培养瓶中接种 2×10^6 个 AM12-pBABEpuro hTERT 细胞。

2. 次日，往这些包装细胞培养瓶内加入 6mL 新鲜培养基，以产生病毒。

3. 下一日，在腔室培养瓶中加入要永生化的 hUC-MSC，浓度为（5~7.5）×10^4/mL。

4. 从包装细胞收集上清液，加聚凝胺到终浓度 8μg/mL，上清液用 0.45μm 滤器过滤。

5. 每个腔室培养瓶中加入 2mL 滤过的反转录病毒上清液。

6. 32℃、1000*g* 离心，37℃孵育过夜。

7. 去除反转录病毒上清液，加入新鲜培养基。

转导后筛选

在细胞类型特异的培养基中，用适合的嘌呤霉素浓度（多数原代培养细胞和干细胞嘌呤霉素终浓度以 2μg/mL 为宜）筛选带有选择性标记（pBABE-嘌呤霉素）的反转录病毒载体。

E. 转导后培养细胞的处理

1. 未获得 *hTERT* 基因的细胞传到 10~12 代时开始死亡；剩余的细胞应为已整合了 *hTERT* 基因的细胞，在随后的传代过程中进行筛选。

2. 建议常规性冻存一部分细胞，以建立与 PD 生长曲线匹配的、处于不同群体倍增水平的转导细胞的储备库；另外，一旦由于污染造成培养细胞丧失时，可节省时间。

3. 用下列公式在每次传代时计算 PD，建立 PD 生长曲线。

$$PD = \ln(N_{finish}/N_{start})/\ln 2$$

此处PD是群体倍增的次数；ln是自然对数；N_{start}是开始接种时的细胞数量；N_{finish}是传代后回收的细胞总数。例如，接种时细胞数为2×10^5，回收后细胞数为3.2×10^6。

$$PD=\ln(3.2\times10^6/2\times10^5)/\ln2$$

$$PD=\ln(16)/\ln2$$

$$PD=2.7726/0.6931=4$$

如果细胞在每次传代中分成4份，则在每次细胞传代后N_{finish}需乘以4。因此上述例子中，如果传代10次，N_{finish}等于（3.2×10^6）×4，10次，或3.4×10^{12}。

例如，开始接种2×10^5个细胞，回收后为3.2×10^6，按一分为四的方式传代10次：

$$PD=\ln(3.4\times10^{12}/2\times10^5)/\ln2$$

$$PD=\ln(1.67\times10^7)/\ln2$$

$$PD=16.6309/0.6931=23$$

4．永生化细胞系建立后的一段时间要检查细胞是否来自最初的材料，而不是实验室其他永生化细胞系污染的结果（参见13.1节）。例如，可以用PCR扩增转入的基因*hTERT*，或用DNA图谱进行分析（参见方案13.1）。

F. hTERT的PCR

1．PCR试剂解冻，置于冰上。

2．制备混合物，记住一定要做阳性对照（其他hTERT阳性的DNA或cDNA样品）和阴性对照（不含DNA模板）：

DNA，100μg/mL	2μL（100ng）
10×PCR 缓冲液（+Mg）	2μL
正链引物（2μmol/L）	2μL
反链引物（2μmol/L）	2μL
dNTP混合物（10mmol/L）	0.4μL
DNA聚合酶	0.1μL
UPW	7.5μL
Q 溶液	4μL
终体积	20μL（含DNA）

3．将试管放入PCR仪，启动程序：94℃预变性7min，95℃变性30s，58℃复性45s，73℃延伸30s，进行33个循环，然后72℃保温10min。用于扩增GC Sam hTERT和pBABe puro-hTERT。

4．PCR产物在1.5%~2%的琼脂糖凝胶中电泳。

22.3.5 供选择的永生化策略

淋巴细胞永生化 早期培养淋巴细胞的尝试（Moore et al.，1967）显示，淋巴细胞永生化可来自培养管中非常致密的细胞团。来自B淋巴细胞谱系的细胞，通过Epstein Barr病毒（EBV）使之永生化。用EBV感染B淋巴细胞使之永生化是现在常用的手段，有很高的成功率（Bolton and Spurr，1996）。

转基因小鼠 转基因小鼠immortomouse（*H-2K^b-tsA58* SV40 large T）携带温度敏感的*SV40LT*基因。来自这种小鼠的多个组织都能形成永生化细胞系，包括结肠上皮（Fenton and Hord，2004）、脑星形胶质细胞（Nobel and Barnett，1996）、肌肉（Ahmed et al.，2004）和视网膜内皮细胞（Su

et al.，2003）。

22.4　生长控制异常

来自肿瘤的培养细胞，以及在体外发生转化的培养细胞都显示出生长控制的异常，如有更高的饱和密度（Dulbecco and Elkington，1973）、在琼脂中形成克隆（Freedman and Shin，1974）、在汇合成单层的同源细胞上生长（Aaronson et al.，1970）。这些细胞对血清和生长因子的依赖都较低，通常能更高效地形成克隆，推测可能是通过过度表达正常或突变癌基因，或丢失、失活正常或突变的抑癌基因，获得了一定程度的自主性生长控制。生长控制常以自分泌方式调节，即细胞分泌自身拥有受体的有丝分裂原（如 TGF-β）；或者表达相应的受体（如 erbB）；或者信号转导过程中的某些阶段永久激活、不受调控（如 hRas）。虽然永生化并不一定意味着生长控制的丧失，但许多细胞很容易从永生化过渡到生长异常，这可能是因为遗传不稳定性是永生化基因型的内因。

22.4.1　停泊不依赖性

许多与赘生物转化相关的特性都是细胞表面改变的结果（Hynes，1973；Nicolson，1976），如与植物凝集素结合的改变（Laferte and Loh，1992）、细胞表面糖蛋白的改变（Bruyneel et al.，1990；Carraway et al.，1992）、细胞黏附分子的改变（Yang et al.，2004）等，许多改变与体内侵袭和转移的发展相关。因为与整合素结合能力的改变，纤连蛋白从转化的成纤维细胞表面丢失（Hynes，1973；Vaheri et al.，1976），这个改变可导致细胞与细胞之间、细胞与基质之间的黏附降低（Yanada，1991；Reevs，1992），也可导致细胞增殖时对细胞黏附和铺展的需求降低。

转化细胞可能缺乏特异的 CAM（如 L-CAM），当该基因被转染回细胞时，则细胞重新表现为正常的、无侵袭力的表型（Merg et al.，1989），因此它们被认为是肿瘤抑制基因。其他 CAM 如果细胞外结构域发生选择性剪接（Rygaard et al.，1992），可能会过度表达，如小细胞肺癌中的 N-CAM（Patel et al.，1989）。整合素的表达和磷酸化的程度也可能发生改变（Persad and Dedhar，2003；Lipscomb and Mercurio，2005），进而可能引起一系列改变，如细胞骨架相互作用的潜在改变、基因转录的调节、细胞与基质的黏附、细胞铺展和细胞增殖的相互关系（Frame and Norman，2008；Zhang et al.，2008）等。

此外，由于细胞间黏附的减少导致细胞与细胞的识别丧失，还会导致细胞生长方式的紊乱、丧失细胞迁移的接触抑制和细胞增殖的密度限制（参见 22.4.2 节）。细胞可脱离支持物，在搅动的悬液中生长，或在琼脂、甲基纤维素等半固体培养基中生长。培养时细胞黏附的改变与细胞从原发的肿瘤组织脱离、随后形成异位转移很相似，但这种相似的机制尚不清楚，很可能涉及新的黏附形成，而这种黏附是通过整合素结合能力的改变促成的（Dowling et al.，2008）。

悬浮克隆（suspension cloning）　Macpherson 和 Montagnier（1964）已证实多瘤转化的 BHK21 细胞可优先生长于软琼脂，而未转化细胞则很难形成克隆。随后发现，细胞经病毒转化后在悬液内形成克隆的能力经常会加强。自发肿瘤的情况尚不清楚，尽管 Shin 和其同事（Freedman and Shin，1974；Kahn and Shin，1979）证实致瘤性与在甲基纤维素内悬浮克隆有很密切的关系。虽然 Hamburger 和 Salmon（1977）证明许多人肿瘤细胞都含有一小部分细胞（<1.0%）可在琼脂中形成克隆，但是许多正常细胞也可以在悬液中形成克隆（Laug et al.，1980；Peehl and Stanbridge，1981；Freshney and Hart，1982）（图 16.11）。在这些细胞中混有正常的成纤维细胞，使得将这种

技术用于鉴定人肿瘤组织短期培养后是否有肿瘤细胞存在的可信度下降，因为这些细胞是否为干细胞的问题仍需进一步确证。

在悬液中形成克隆的技术已在第16章介绍过（参见方案16.4、方案16.5）。选择的悬浮培养基不同，赘生性细胞的分析结果会有差异。有报道（Neugut and Weinstein，1979）称琼脂只允许转化程度高的细胞形成克隆，而琼脂糖（缺乏硫酸多糖）则选择性较差。Montagnier（1968）也发现未转化的BHK21细胞能在琼脂糖中生长，但不能在琼脂中生长，如果琼脂糖中加入硫酸葡聚糖则生长被抑制。

22.4.2 接触抑制

彩版14

接触抑制的消失在形态学上的表现：形成丧失方向性的单层细胞（彩版14a、b），或细胞灶中央的细胞变圆、周围围绕的细胞表现正常（图22.3和彩版14c）。培养的人神经胶质瘤表现出生长方式紊乱和生长密度限制降低，它比正常的胶质细胞系拥有更高的饱和密度（图22.7）（Freshney et al.，1980a，1980b）。由于细胞大小的变化会影响饱和密度，在饱和密度时［^{3}H］标记胸腺嘧啶脱氧核苷的标记指数增加（参见方案23.11），或者用细胞周期蛋白（如Ki67和PCN）的免疫染色，都成为判断生长密度限制降低的较好方法。人胶质瘤在饱和密度用［^{3}H］标记的胸腺嘧啶脱氧核苷标记24h，标记指数为8%，而正常的胶质细胞的指数是2%（Guner et al.，1977）。

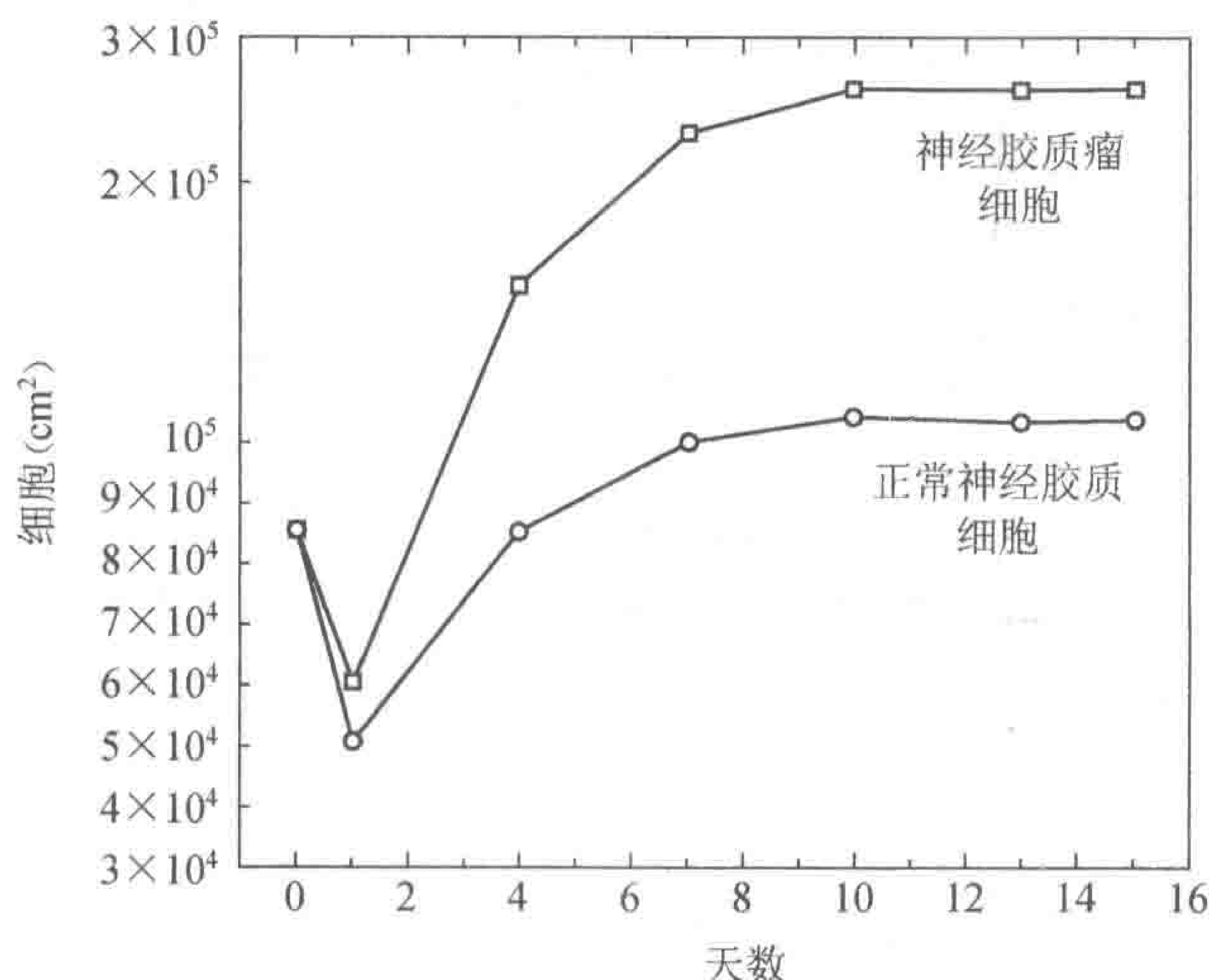


图22.7 细胞增殖的密度限制。培养的来自正常大脑的胶质细胞（圆圈）和来自神经胶质瘤的细胞（方框）的平台期（饱和密度）存在差异。细胞接种到13mm盖玻片上，48h后，盖玻片转到含20mL生长培养基的9cm培养皿中，最低限度地消耗培养基

彩版6

转化还伴随有上皮细胞的形态改变，由于细胞间接触减少，出现明显的异质性（参见彩版6d、7d~f）。有些情况下，如转化细胞未分化时，细胞形态丧失其典型的上皮细胞样特性，变为成纤维细胞样。这种被称为上皮细胞间质转型（epithelial-mesenchymal transition，EMT），更具侵袭性的表型与*MET*癌基因相关。

彩版7

方案 22.3 细胞增殖的密度限制

概要

在无限制培养基中使细胞生长达到饱和密度，通过放射自显影方式测定被［^{3}H］胸腺嘧啶脱氧核苷标记细胞的百分比。

材料

无菌或无菌制备

- 准备用于传代的培养细胞
- 生长培养基
- 维持培养基（无血清或生长因子）含 37kBq/mL（1.0μCi/mL）［^{3}H］标记胸腺嘧啶脱氧核苷，74GBq/mmol（2Ci/mmol）
- D-PBSA
- 胰蛋白酶，0.25%
- 24 孔培养板，含直径 13mm 的盖玻片
- 培养皿，9cm（细菌学级别，每张盖玻片 1 个平皿）

操作步骤

1. 胰酶消化细胞，接种于 24 孔板（孔中含直径为 13mm 的盖玻片），每孔接种 1mL（细胞浓度为 1×10^{5} 个/mL）。
2. 在湿润的 CO_2 孵箱中培养细胞 1~3 天。
3. 将盖玻片转到 9cm 培养皿中，每平皿中含 20mL 培养基，将培养皿放入 CO_2 孵箱中。
4. 继续培养，当盖玻片上的细胞汇合后每 2 天换一次液。
5. 每 3~4 天取 2 个盖玻片，胰蛋白酶消化，计数细胞数目。当盖玻片上的细胞变密后，可往胰蛋白酶中加入 200~500U/mL 胶原酶，以使细胞完全脱落便于计数。
6. 当细胞生长停止（即在连续的两次计数中细胞无明显增加），加 2.0mL 37kBq/mL（1.0μCi/mL）［^{3}H］标记的胸腺嘧啶脱氧核苷，74GBq/mmol（2Ci/mmol），继续孵育细胞 24h。

▲安全提示 小心认真地处理［^{3}H］标记胸腺嘧啶脱氧核苷。尽管它是低能量的β放射源，但作用于 DNA 可诱导辐射损伤。操作时必须戴手套，不要在水平层流罩中操作，而应在生物危害级别或细胞毒性药物级别的环境下操作［^{3}H］标记胸腺嘧啶脱氧核苷（参见 6.7.1 节），按照地方法规中的放射性同位素管理办法正确地处理废弃的液体和固体。

7. 将盖玻片放回 24 孔板，消化细胞做放射自显影（参见方案 23.13-Su）。细胞可在悬液中固定，滴在载玻片上做染色体分析（参见方案 13.4，无需低渗处理），或用甩片机将细胞离心到载玻片上（参见方案 18.4）。

注意事项 因为细胞的厚度和［^{3}H］的β辐射穿透力很弱，做放射自显影前用胰蛋白酶消化高密度的培养细胞是非常必要的。下层被标记的细胞无法被对放射敏感的感光乳胶检测出来，因为β粒子会被上层覆盖的细胞所吸收（β粒子在水中平均通过距离约为 1μm）。如果细胞达到饱和密度时为单层，则此步可省略。将盖玻片细胞面向上贴在载玻片上，准备进行放射自显影。

分析 在显微镜下观察放射自显影情况，计数细胞总数和被标记的细胞数（参见图 23.18），计算标记指数，即标记的细胞数量占细胞总数的百分比。

变通 处于 DNA 合成阶段的细胞，可被溴脱氧尿苷（BrdU）标记，然后用抗体检测 BrdU 标记的 DNA（Life Technologies）。处于细胞周期的人细胞可用 Ki67 单克隆抗体（Life Technologies）检测 DNA 聚合酶，或用抗 PCNA 抗体检测增殖细胞核抗原（PCNA，Life Technologies）。通常情况下，[^{3}H] 标记胸腺嘧啶脱氧核苷的结果与 BrdU 的检测结果相互吻合，而被 Ki67 和 PCNA 标记的细胞则更多些，因为相应的抗原在整个周期内都存在，而不仅仅限于 S 期。

在无限制培养基中可获得较高的生长密度，在有滤膜的孔中培养细胞也可获得同样结果。选择一小于培养孔直径的滤膜（即 Corning 8mm 滤膜放入 24 孔板的培养孔中），计数平台期细胞的数量，进行放射自显影或用抗 Ki67 抗体或抗 PCNA 抗体进行免疫染色。

22.4.3 血清依赖

与相应的正常细胞相比，转化的细胞对血清的依赖性低（Temin，1966；Eagle et al.，1970），部分是由于肿瘤细胞可分泌生长因子（Todaro and DeLarco，1978）。这些因子统称自分泌生长因子，其含义是：①细胞能分泌这些因子；②细胞对该因子有相应的受体；③在该因子的作用下细胞可进行有丝分裂。其中一部分因子对正常细胞有明显的转化活性（如 TGF-β），通过与 EGF 受体结合，诱导有丝分裂（Richmond et al.，1985），但这种转化是可逆的，因此并不是真正的转化（参见 22.2 节）。这些因子可引起非转化细胞表现出转化细胞的表型，在悬液中生长（Todaro and DeLarco，1978）。可用被检测细胞产生的条件培养基处理 NRK 细胞，使其在悬液中形成克隆，观察效果（参见方案 16.4、方案 16.5）。

肿瘤细胞可产生许多造血生长因子，如白细胞介素 1、2、3，以及集落刺激因子（CSF）（Fontana et al.，1984；Metcalf et al.，1990）。有人推测（Cuttitta et al.，1985）一些因子，如胃泌素释放肽、血管活性肠肽（VIP）和人绒毛膜促性腺激素（hCG），这些目前被认为是肺癌细胞产生的异位激素，实际上可能是自分泌生长因子。自分泌生长因子可以用免疫染色（参见方案 18.6）或增加基因表达来检测，但它们作为转化标记物的价值有限，因为许多正常细胞，如胶质细胞、成纤维细胞和内皮细胞在增殖时也产生自分泌因子。

22.4.4 癌基因

转化细胞的自主性生长控制也可通过癌基因的表达而获得，如表达为修饰过的受体（如 *erb-B2* 癌基因产物）、修饰过的 G 蛋白（如突变的 *ras*）。还可以通过过表达信号转导过程中阶段调节基因（如 *src*），或过表达转录调控基因（如 *myc*、*fos*、*jun*）而获得（Bishop，1991）。许多情况下，基因产物持续激活且不受调节（Alberts et al.，2014）。过表达癌基因可用多种手段检测，如免疫染色（参见方案 18.6）、原位杂交、免疫印迹（检测蛋白质产物）、RT-PCR（检测 mRNA）、微矩阵分析等。在某些情况下，可以通过特异抗体或基因测序定性、定量地将癌基因（如 *erb-B2*、活化的 *Ha-ras*）的产物与正常产物（如 EGF 受体、正常 *ras*）区分开。

22.5 致瘤性

转化过程包括多个步骤，最终的结果是产生赘生性细胞（Quitanilla et al.，1986；Pinto and Clevers，2005；Fearon and Vogelstein，1990）。虽然来源于恶性肿瘤的细胞系被认为是已转化的细胞，但它们还可进一步转化，表现为生长率增加、停泊依赖减弱、含更多明显的非整倍体细胞及永生化。这意味着恶性转化需要一系列步骤，但它们无需相互协调或相互依赖，也没有必需的、单个的致瘤步骤。此外，来自一个肿瘤的所有细胞谱系不一定要有同样的转化特性，同样的特性也不需要在每一个肿瘤都表达。肿瘤的演进可能意味着新特性的表达或旧特性的消失，它将可能导致转移或自发性减轻。

因此转化包括若干步骤，其顺序可能由环境选择压力决定。体外生长没有严格的限制，所以事件发生的顺序可能与体内不同。

22.5.1 恶性化

恶性化是指如果植入同源的宿主体内，或异种移植到免疫缺陷动物体内，细胞具有能产生侵袭性肿瘤的能力。虽然恶性化的发展可被认为是一个单独的表型事件，但它常与生长控制的异常相伴，提示一些导致生长控制异常的损伤也可能会导致恶性化。其中一个明显的例子就是细胞与细胞的相互作用丧失，导致细胞失去对增殖（细胞增殖的密度限制）和迁移的控制（接触抑制）。

目前有两种方法用于研究恶性化相关的特性：①来自恶性肿瘤并经过鉴定的细胞；②体外经病毒或化学致癌物转化的或经癌基因转染的、产生致瘤性的细胞，与未转化的细胞进行比较。第二种方法可提供来自同一谱系的克隆，即已被证实恶性化的转化细胞克隆，与同一细胞谱系来源的未转化的、非恶性化的克隆相比较。不幸的是，在体外转化细胞的许多特征在来自自发肿瘤的细胞中都观察不到。理想状态下，肿瘤细胞和相应的正常细胞能被分离和鉴定。但不幸的是，这很少能实现。即使细胞可能属于同一个谱系，它们在谱系中的地位并不总是很清楚，因此也就无法进行严格比较了。虽然在正常成年组织中大多数细胞将分化、不再增殖，而相应的肿瘤细胞则增殖、不分化，这样不考虑其恶性化，肿瘤细胞可与正常细胞区分开。此外，许多（虽然不是大多数）来自肿瘤的细胞在培养时并非很长寿，在肿瘤的进展中起关键作用的细胞（化疗的主要目标）也许很少，相当于正常组织中干细胞的数量。目前尚未有结论性的证据显示这些细胞可被培养，但向这个方向的努力正在逐渐增多（Graziano et al.，2008；Vermulen et al.，2008；Dick，2009）（参见短篇综述 26.3）。

22.5.2 肿瘤移植

恶性化唯一被普遍接受的特征是在体内能形成具有侵袭或转移能力的肿瘤。可移植的肿瘤细胞（约 1×10^6 个）注射入同源的宿主体内，能产生侵袭性肿瘤的比例很高，而 1×10^6 个同样来源的正常细胞则不行。已用免疫抑制或免疫缺陷动物制备出动物模型，用以研究人肿瘤细胞的致瘤性。可遗传的无胸腺裸鼠（Giovanella et al.，1974）和胸腺切除的受辐射鼠（Bradley et al.，1978a；Selby et al.，1980）已被广泛用来做异种移植的宿主。移植物的成瘤率会有不同，另外许多已确

知的肿瘤细胞系和肿瘤活检组织在异种移植时不能产生肿瘤；这些细胞系或组织虽然可能会在局部产生侵袭，但通常不发生迁移。用亚致死剂量照射宿主裸鼠（30~60Gy），或使用无脾无胸腺（scid）小鼠，或将细胞植入 Matrigel™（Corning）（Pretlow et al.，1991）都可使成瘤率有所提高。尽管有出现假阴性的可能，但致瘤性仍是恶性化的一个很好的指标。

22.5.3 侵袭力

致瘤性的鉴定通常需要做肿瘤的组织学检查，以确定其在组织病理学方面与原发的肿瘤相似，并证明其具侵袭性。但是如果细胞不致瘤，或无移植所需设备，或设备无法令人满意，则可以做一些体外检测。其中有些检测也有模型，比在体检测更容易定量。

鸡绒毛尿囊膜实验（chick chorioallantoic membrane） 绒毛尿囊膜（CAM）（见图 11.4d、e）检测可在鸡蛋内的鸡胚或体外 CAM 的移植块中进行。Easty 和 Easty（1974）指出 CAM 的侵袭可在器官培养中证明，有人（Hart and Fidler，1978）尝试构建了能定量检测肿瘤细胞穿透 CAM 能力的小室，取得了一定的成功。在鸡蛋中做 CAM 分析的优点是还可以同时显示血管发生（见 22.5.4 节；彩版 15f、g），之后的组织学检查可显示肿瘤细胞是否穿过下方的基底膜。

彩版 15

器官样对抗实验（organoid confrontation） Mareel 等（1979）建立了一个侵袭力检测的体外模型，用鸡胚的心脏组织块与重新聚集成簇的肿瘤细胞共培养（图 22.8）。侵袭力可能与细胞的恶性肿瘤起源相关，进行性地引起宿主的组织破坏。用这项技术分析人肿瘤细胞显示恶性化与侵袭性密切相关（de Ridder and Calliauw，1990）。这项技术虽然被广泛应用（如 Vanhoecke et al.，2005），但它很难定量，需要有丰富的组织学经验。

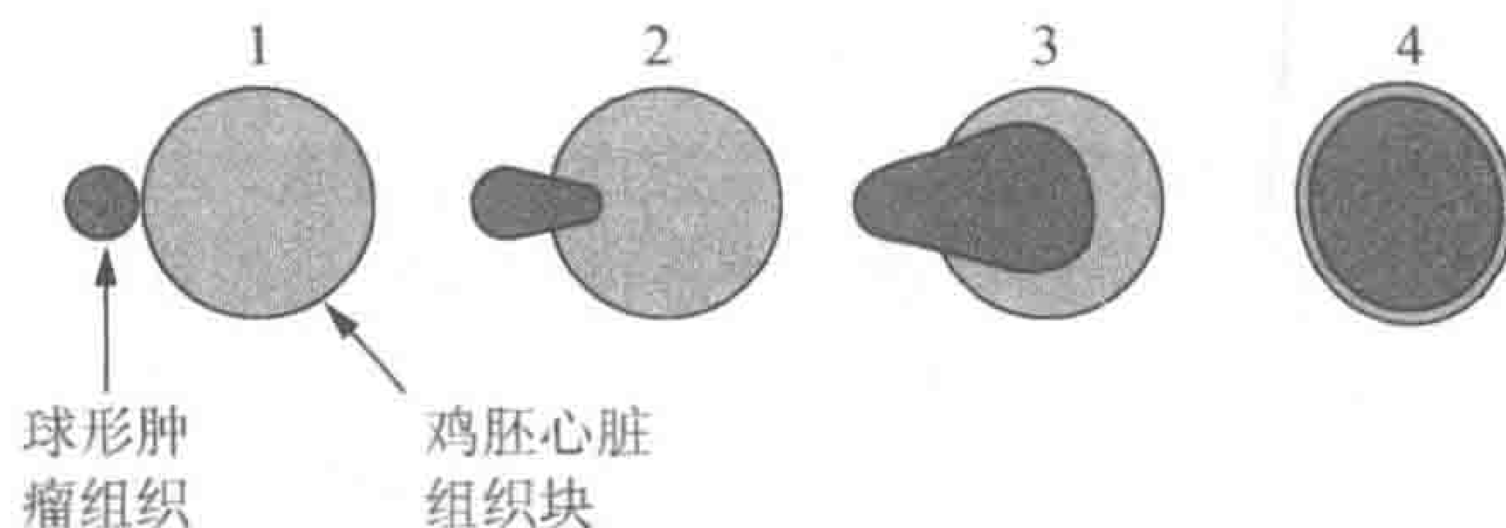


图 22.8 鸡心脏实验。 球形肿瘤组织（参见方案 20.2）与 8 天鸡胚的心脏组织块共培养。①数小时后肿瘤组织与心脏组织接触；②24~48h，开始进入鸡胚心脏组织；③肿瘤组织在心脏组织块中扩散；④8~10 天完全替代心脏组织（Mareel et al.，1979）

滤膜孔插件（filer well insert） 根据细胞穿过包被有基质胶或其他细胞外基质成分的滤膜的能力，目前建立了一系列滤膜孔技术（图 22.9）（Repesh，1989；Schlechte et al.，1990；Brunton et al.，1997；Lamb et al.，1997）。根据穿入凝胶的程度或穿透滤膜到达滤膜对侧的情况来评估侵袭能力，并用组织学观察细胞的数量和移动的距离，或提前用 ^{125}I 标记细胞，计数滤膜对侧或培养皿底部的放射活性。这样更容易定量，但屏障中缺乏体内侵袭时最常见的正常宿主细胞。基质胶穿透实验还可以用来测量基质的降解情况，反映细胞产生蛋白酶或糖苷酶的情况。但在这些实验中尚不清楚细胞为什么不自己产生降解酶，而是依靠基质诱导细胞产生的蛋白酶。作者实验室初步的实验表明：肿瘤细胞接种到已铺展了单层正常细胞的滤膜表面，到达对侧小室的细胞比作为对照的接种正常细胞多。在接种前先消化一下可使两种细胞都具有侵袭力（Christie and Freshney，未发表观察）（彩版 19e，图 22.9）。

彩版 19

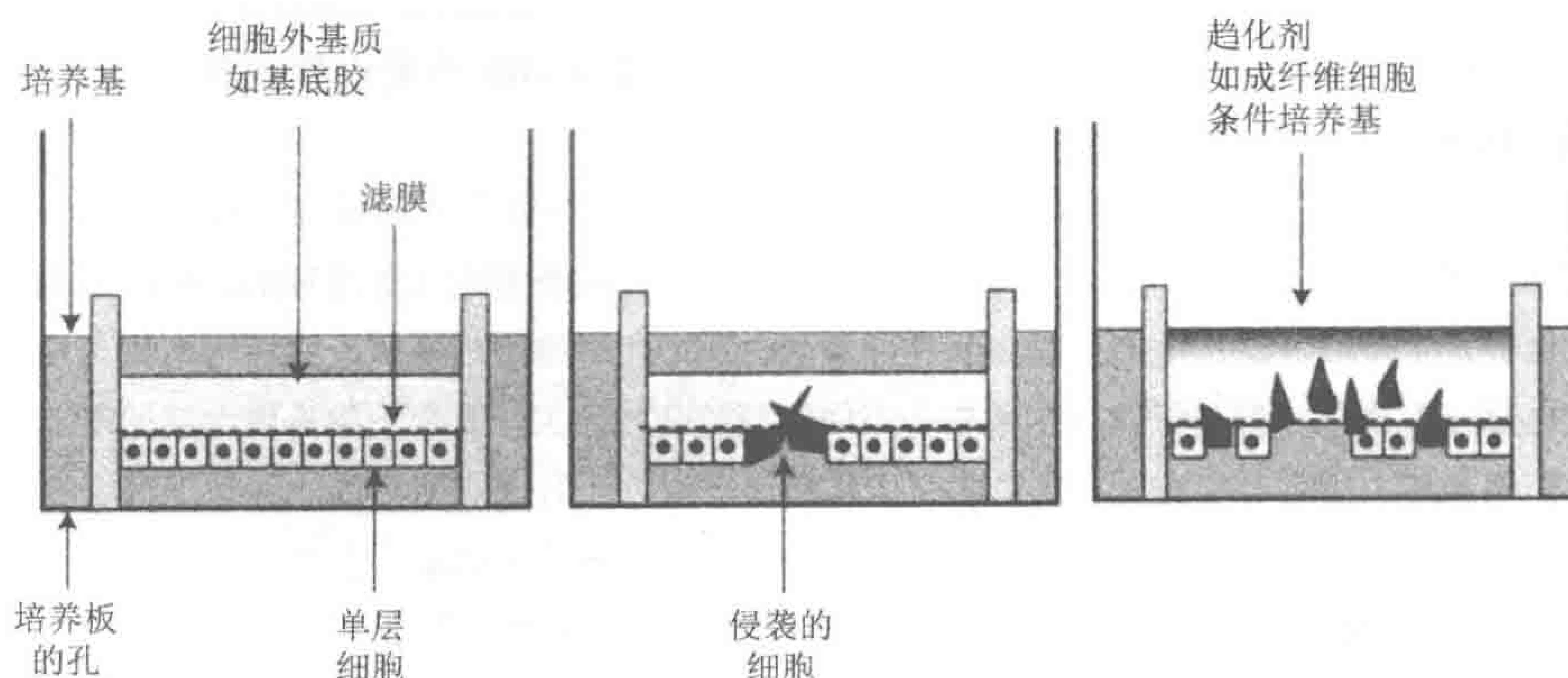


图 22.9 滤膜孔侵袭实验。滤膜插件放入培养孔，细胞铺展在滤膜下表面，细胞穿过滤膜进入不含生长因子的 Matrigel™ 中，如在基底胶一侧加入趋化剂（如成纤维细胞条件培养基），则可促进该作用（Brunton et al.，1997）

22.5.4 血管发生

肿瘤细胞释放的因子，包括 VEGF（Joukov et al.，1997）、FGF-2（Thomas et al.，1997）和血管生成因子（Hu et al.，1997），可以诱导新的血管形成（Folkman，1992；Skobe and Fusenig，1998）。肿瘤块、培养细胞团块或细胞提取物等种植到鸡蛋 CAM 表面，可促进血管形成，6~8 天后即可用肉眼观察（彩版 9）。但由于这项分析不易定量，因此可通过在滤膜孔中培养血管内皮细胞来检测其促进细胞迁移（Bagley et al.，2004）、产生血管内皮生长因子（VEGF）（Buchler et al.，2004）或形态发生（Chen et al.，1997；Ment et al.，1997）等。内皮细胞可从微载体迁移（参见方案 22.4）到合适的基质，如纤维素（Nehls and Drenckhahn，1995）或基质胶（Crabtree and Subramanian，2007）中，该过程中的内皮细胞的迁移和形态发生可用于检测血管发生（图 22.10）。


彩版9

方案 22.4 体外血管发生检测*

背景

构成血管内壁的内皮细胞通常处于静止状态，当用血管生成因子刺激时可被诱导发生增殖、迁移，形成新血管，这个过程称为血管发生。血管发生在肿瘤生长和糖尿病视网膜病变等病理情况下出现，同时也会出现在伤口愈合、胚胎发育等正常情况下（Carmeliet，2005）。许多血管生成因子和抑制因子的检测涉及在体实验，如鸡绒毛尿囊膜（CAM）分析和兔角膜分析。这些检测都有一定技术难度，较难操作，而且还需要用到动物和胚胎，重复性也是这些在体实验的难点。

细胞外基质（ECM）在调节血管发生中起主要作用（Adams and Watt，1993）。从 Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤细胞系提取 ECM（Kleinman et al.，1986）用作体外血管发生实验的支持物。早期的体外血管发生检测实验中，要先在聚合的基质（如基底胶）表面接种内皮细胞，形成二维的培养系统。在这样的二维系统分析血管发生的生长因子或抑制因子，有时会得到模棱两可的结果。但是

* 来自 V. Subramanian，Department of Biology and Biochemistry，Building 4 South，University of Bath，Claverton Down，Bath BA2 7AY，England，UK. bssvss@bath.ac.uk。

如果提供合适的培养条件，内皮细胞可形成管状结构，就像在 3D 基质中形成的内皮管（Nehls and Drenckhahn，1995），这是一个替代体内检测的好方法。

生长有内皮细胞的 Cytodex-3 微载体珠可包埋在基质胶内，为评估或测量血管发生的活力提供一个方便、迅速、可靠的体外检测系统（Crabtree and Subramanian，2007）。这个方法改良自 Nehls 和 Drenckhahn（1995）建立的体外血管发生检测方法，他们用凝血酶使纤维蛋白原产生纤维蛋白基质，然后用这种基质包埋已包被好细胞的 Cytodex-3 珠子，但是纤维蛋白原聚合形成的凝胶变数较大，对用于制备聚合物的凝血酶的批次变化很敏感。而用基质胶制备的凝胶则有很高的一致性和可重复性，且无需用到酶，因此是很好的 3D 的支持物。改良的血管发生检测法用生长因子减少基质胶与内皮细胞包被的 Cytodex-3 珠子的交联，该方法可信、容易操作，当内皮细胞管从 Cytodex-3 珠子向四周辐射生长时，结果容易定量（彩版 15e）（Crabtree and Subramanian，2007）。


彩版 15

概要

消化单层细胞，接种在 Cytodex-3 珠子表面。在有 8 个小室的载玻片的孔中，或 48 孔板的孔中加入基底胶，将已包被好细胞的珠子包埋入凝胶，在培养基中孵育。用血管生成因子、抑制剂或其他药物处理。染色后分析结果。

材料

无菌或无菌制备

- 内皮细胞系（参见 25.3.6 节，表 25.1，见补充材料中的附录III）
- 含正常量 FBS 适宜细胞系生长的培养基（参见方案 22.18-Su），含 100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素。转铁蛋白和胰岛素（可选；Invitrogen）
- 低血清培养基：培养基与上同，含 0.1% FBS。低血清培养基用于血管发生检测的基础培养基。
- NEAA（100×储存液；Invitrogen）
- 胎牛血清（FBS；Invitrogen）
- 低生长因子（GFR）、不含酚红的基底胶（BD Biosciences），实验前冻融 2~3 次（这步很重要，减少阴性对照中背景管状结构的形成）
- 人重组碱性成纤维生长因子（bFGF）（R&D System）
- 胰蛋白酶 EDTA 或其他细胞系适宜的解离剂
- 磷酸盐缓冲液（D-PBSA）
- Cytodex-3 微载体珠（GE Life Sciences）
- Iwaki 含小室的载玻片，8 孔（Sterilin）
- 培养瓶，25cm^2 和 75cm^2
- 离心管
- 已插好的加样枪头（Thermo Scientific）

非无菌的

- 冰桶
- 水浴
- 多聚甲醛缓冲液：4%多聚甲醛用 DPBSA 配制，pH 7.4

- 双苯酰亚胺（Hoechst 33258），20μg/mL，PBSA 配制

操作步骤

A. 在 Cytodex-3 珠子表面培养细胞（包埋入基底胶前 48h）

1. 根据指导手册准备 Cytodex-3 珠子并消毒。
2. 15mL 试管中加入 2mL 含 Cytodex-3 珠子的 PBSA，使其沉降。
3. 加 5mL 新鲜的 D-PBSA 清洗。等待珠子沉降后弃 D-PBSA。
4. 加 5mL 含 10% FBS 的完全培养基。
5. 等待珠子沉降后弃培养基。
6. 往已沉降的珠子中加 5mL 新鲜培养基。
7. 加入细胞前，Cytodex-3 珠子在 5mL 适合的培养基中 37℃，5% CO_2，平衡 1h（轻轻盖住管盖）。
8. 从 $25cm^2$ 培养瓶消化已达 80%~90%汇合率的单层内皮细胞，悬于 6mL 培养基中。
9. 计数细胞。
10. 去除平衡珠子的培养基，向珠子中加入 2mL 含细胞的完全培养基，使细胞的浓度为 30 个/珠，置于 $25cm^2$ 培养瓶培养。
11. 培养瓶直立放入孵箱，37℃，5% CO_2 条件下孵育 4h，每 30min 轻柔晃动培养瓶。
12. 孵育最后阶段再加入 3mL 培养基，培养瓶水平放置于孵箱中，继续在 37℃，5% CO_2 条件下孵育 48h，使细胞在珠子表面生长、汇合。

B. 基底胶中加入已包被细胞的 Cytodex-3 珠子

1. 4℃环境下，冰上解冻基底胶过夜（珠子包埋入基底胶前一天）。
2. 检查珠子表面是否已完全覆盖了健康的内皮细胞（与彩版 18c 进行比较）。


彩版 18

3. 将细胞包被的 Cytodex 珠子转入 15mL 无菌试管，待珠子沉降。
4. 吸去培养基，10mL D-PBSA 清洗珠子一次，再用低血清培养基清洗两次。
5. 在低血清培养基中孵育珠子，37℃，5% CO_2，1h。
6. 在 Iwaki 8 孔小室载玻片上做好标记以便鉴定（也可用 48 孔板），每个样品最少 3 个孔。阴性对照：培养基只含 0.1% FCS；阳性对照：培养基中加入如 bFGF 等因子。
7. 计数珠子，稀释到每 75μL 含 40 个珠子，在冰上放置 2~5min；以 1∶1（V∶V）比例加入基质胶。轻柔混合使珠子在悬液中分布均匀。
8. 向 8 孔小室载玻片的每孔加入 150μL 基质胶（含已包被细胞的珠子），37℃，5% CO_2 孵育，等待基底胶在孔中制备好。
9. 一旦基底胶制备好，每孔加 500μL 低血清培养基，其中含用于检测的生长因子或抑制剂。
10. 37℃，5% CO_2 孵育。

C. 分析

固定和染色

1. 第 5 天或根据需要，4%多聚甲醛缓冲液（pH 7.4）4℃固定基底胶包埋珠的培养细胞，15min。
2. Hoechst 33258 或 DAPI 染色（参见 DAPI 染色流程）。荧光显微镜观察每个突起的细胞数量（图 22.8，彩版 15e）。

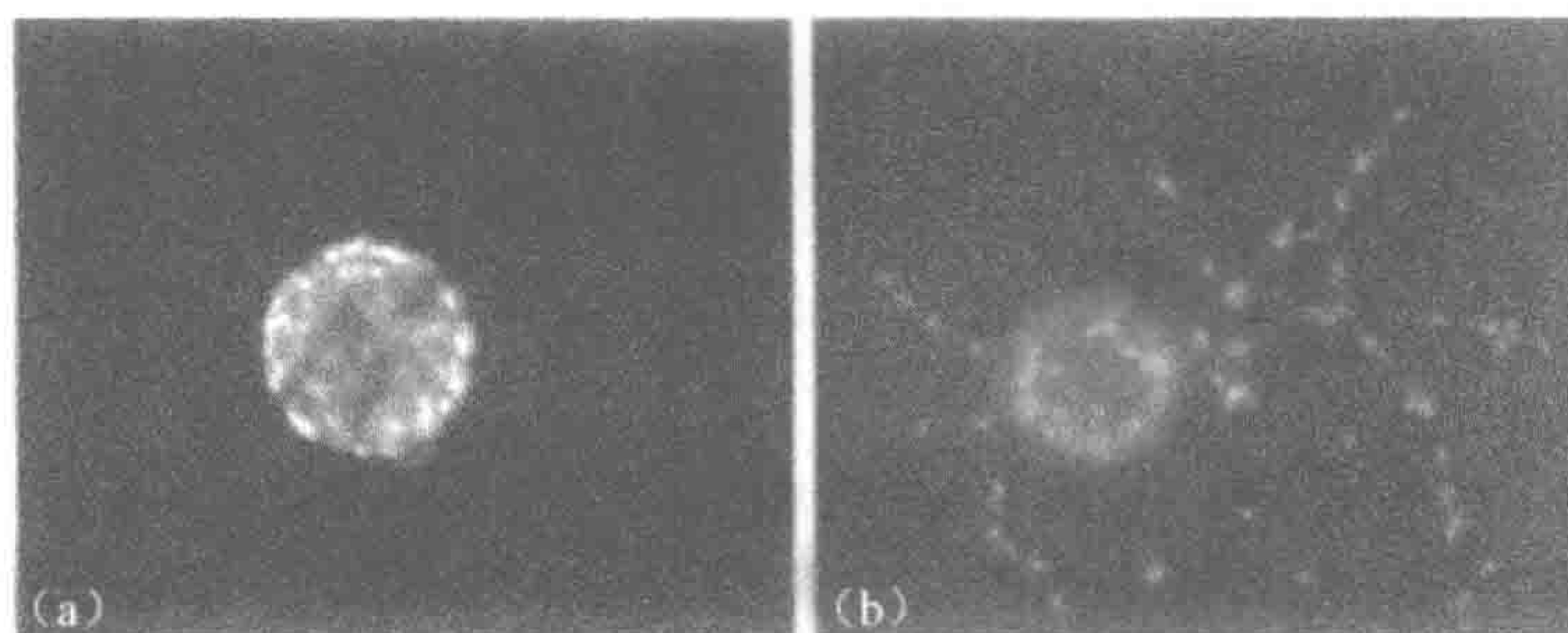

彩版 15

细胞迁移和管状物形成的定量分析

1. 每日用显微镜观察细胞，连续 5 天。
2. 计数有细胞长出（细胞突起）的珠子，以百分比表示。细胞突起指细胞从珠子长出 150μm 以上，

由3个或更多细胞构成（Nehls and Drenckhahn，1995），Cytodex-3微载体珠直径为150μm，可作为测量细胞突起的内部参照物。管状物形成可用内皮细胞标记物的抗体染色来确认，如Ⅷ因子、PECAM-1或内皮糖蛋白（参见方案25.17-Su）。

3．用倒置显微镜记录每个珠子上细胞突起的数目。



彩版15

图22.10 体外血管发生检测。生长在Cytodex-3珠子表面的内皮细胞被诱导形成管状。(a)内皮细胞在Cytodex-3珠子表面形成单层（对照），DAPI染色；(b）内皮细胞生长在Cytodex-3珠子表面，用10ng/mL FGF诱导其形成管状，DAPI染色（来自V. Subamanian，见彩版15e）

应用 利用基底胶微载体珠检测血管发生是一个可信的、可重复的方法，与以前用的单一成分相比，基底胶能更好地代表ECM。基底胶容易制备，不需要酶使其聚合。微载体珠提供了一个便于细胞管状物辐射生长的基础，使管状物形成的测量更加容易。这个检测可用来检测血管形成的活力，估计血管生成分子的结构功能的相互关系，研究诱导血管发生的必需因子的联合作用等。这个体外检测系统也可用来检测血管发生的抑制物，以及血管发生过程中的基因表达研究、血管发生诱导物表达的特征等。它减少了动物和胚胎的使用，因此引发的伦理问题也较少。由于它是一个三维系统，可更好地模拟体内环境。

22.5.5 纤溶酶原活化因子

转化细胞分泌有所增加的产物还有蛋白水解酶（Mahdavi and Hynes，1979），很早人们就认识到它与侵袭生长相关（Liotta，1987）。由于蛋白水解活性与许多正常细胞表面相关，而一些肿瘤细胞中该活力消失，因此当用它作为判断标准时，需使用相应的正常细胞作为对照。纤溶酶原活化因子（PA）在一些人胶质细胞瘤培养中比正常脑胶质细胞培养要高（Hince and Roscoe，1980；Frame et al.，1984）（图22.11），其他的培养也早有显示PA与多种不同的肿瘤相关（de Vries et al.，1995；del Vecchio et al.，1993；Schwartz Albiez et al.，1991）。可通过纤维素凝块降解分析，或者测量从^{125}I标记的纤维素释放游离的^{125}I来测量PA（Unkless et al.，1974；Strickland and Beers，1976）。除此以外，Whur等（1980）还建立了简单的色谱分析法。

据推测，一些肿瘤可溶性尿激酶型PA（uPA）比组织型PA（tPA）升高明显（Markus et al.，1980；Duffy et al.，1990），所以同时使用色谱分析和酶谱分析效果较好（Davies et al.，1993；Boxman et al.，1995），然后再用免疫印迹法确定每种类型PA的比例。

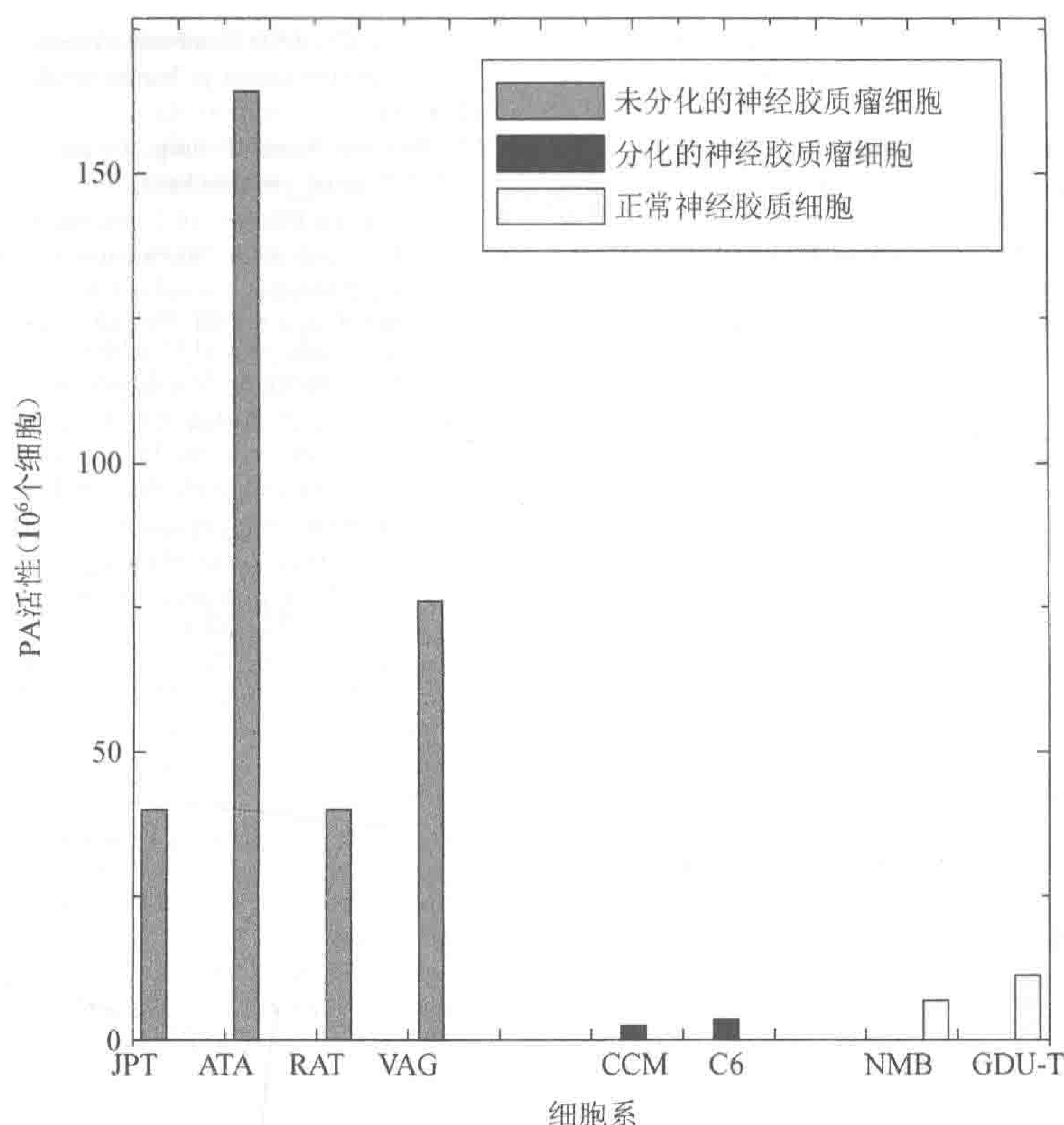


图 22.11 纤溶酶原活化因子。 肿瘤细胞在体外产生 PA（单位根据具体情况而定）。4 种胶质瘤（JPT、ATA、RAT 和 VAG）的 PA 活性高于来自正常大脑的培养细胞（NMB-C、GDU-T）。同时发现少数能产生分化的神经胶质细胞标记物——神经胶质纤维酸性蛋白的细胞 CCM 和 C6，其 PA 值是所有这些细胞中最低的（数据来自 M. Frame）

参考文献

Aaronson SA, Todaro GJ, Freeman AE (1970). Human sarcoma cells in culture: Identification by colony-forming ability on monolayers of normal cells. *Exp. Cell. Res.* **61**:1–5.

Adams JC, Watt FM (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**:1183–1198.

Ahmed I, Collins CA, Lewis MP, Olsen I, Knowles JC (2004). Processing, characterisation and biocompatibility of iron-phosphate glass fibres for tissue engineering. *Biomaterials* **25**(16):3223–3232.

Alberts A, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2014). *Essential cell biology*, 4th ed. New York: Garland Science, pp. 217219.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10114–10118.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2009). *Current protocols in molecular biology*. Hoboken, NJ: Wiley.

Backsch C, Wagenbach N, Nonn M, Leistritz S, Stanbridge E, Schneider A, Dürst M (2001). Microcell-mediated transfer of chromosome 4 into HeLa cells suppresses telomerase activity. *Genes Chrom. Cancer* **31**(2):196–198.

Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C., Madden SL, Teicher BA (2003). Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: Characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res.* **63**:5866–5873.

Bernt KM, Hunger SP. (2014). Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front. Oncol.* **4**:54.

Biedler JL. (1976). Chromosome abnormalities in human tumour cells in culture. In FoghJ (ed.), *Human tumor cells in vitro*. New York: Academic Press.

Bishop JM (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**:235–248.

Blackburn EH (2005) Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* **579**:859–862.

Boccaccio C, Comoglio PM (2014). MET, a driver of invasive growth and cancer clonal evolution under therapeutic pressure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **31C**:98–105.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C-P, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**:349–352.

Bolton BJ, Spurr NK (1996). B-lymphocytes. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 283–298.

Bourillot PY, Waltzer L, Sergeant A, Manet E (1998). Transcriptional repression by the Epstein-Barr virus EBNA3A protein tethered to DNA does not require RBP-Jkappa. *J. Gen. Virol.* **79**:363–370.

Boxman DLA, Quax PHA, Lowick CWGM, Papapoulos SE, Verheijen J, Ponec M (1995). Differential regulation of plasminogen activation in normal keratinocytes and SCC-4 cells by fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **104**:374–378.

Bradley NJ, Bloom HJG, Davies AJS, Swift SM (1978). Growth of human gliomas in immune-deficient mice: A possible model for pre-clinical therapy studies. *Br. J. Cancer* **38**:263.

Brunton V, Ozanne B, Paraskeva C, Frame M (1997). A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an *in vitro* model for the progression of colon cancer. *Oncogene* **14**:283–293.

Bruyneel EA, Debray H, de Mets M, Mareel MM, Montreuil J (1990). Altered glycosylation in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells after transformation by murine sarcoma virus. *Clin. Exp. Metast.* **8**:241–253.

Bryan D, Sexton CJ, Williams D, Leigh IM, McKay I (1995). Oral keratinocytes immortalized with the early region of human papillomavirus type 16 show elevated expression of interleukin 6, which acts as an autocrine growth factor for the derived T103C cell line. *Cell Growth Differ.* **6**:1245–1250.

Bryan TM, Reddel RR (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur. J. Cancer* **33**:767–773.

Bryant PE, Gray LJ, Peresse N (2004). Progress towards understanding the nature of chromatid breakage. *Cytogenet. Genome Res.* **104**(1–4):65–71.

Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Lavey RS, Hines OJ (2004). Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression. *Cancer* **100**:201–210.

Burke JF, Price TNC, Mayne LV (1996). Immortalization of human astrocytes. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 299–314.

Campisi J (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**:685–705.

Carmeliet P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932–936.

Carraway KL, Fregien N, Carraway KL III, Carraway CA (1992). Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation. *J. Cell Sci.* **103**:299–307.

Cesare AJ, Reddel RR (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* **11**:319–330.

Chen C-S, Toda K-I, Maruguchi Y, Matsuyoshi N, Horriguchi Y, Imamura S (1997). Establishment and characterization of a novel *in vitro* angiogenesis model using a microvascular endothelial cell line, F-2C, cultured in chemically defined medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:796–802.

Counter C.M., Botelho FM, Wang P, Harley CB, Bacchetti S. (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* **68**:3410–3414.

Crabtree B, Subramanian V (2007). Behavior of endothelial cells on Matrigel and development of a method for a rapid and reproducible in vitro angiogenesis assay. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **43**:87–94.

Croce CM (1991). Genetic approaches to the study of the molecular basis of human cancer. *Cancer Res.* **51**(suppl.):5015s–5018s.

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD (1985). Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* **316**:823.

DAPI Staining Protocol (http://ruthazerlab.mcgill.ca/protocols/DAPI_Staining_protocol.htm) .

Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR (1993). A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumour burden and prolongs survival of mice bearing ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res.* **53**: 2087–2091.

De Ridder L, Calliauw L (1990). Invasion of human brain tumors *in vitro*: Relationship to clinical evolution. *J. Neurosurg.* **72**:589–593.

De Silva R, Moy EL, Reddel RR (1996). Immortalization of human bronchial epithelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 121–144.

De Silva R, Whitaker NJ, Rogan EM, Reddel RR (1994). HPV-16 E6 and E7 genes, like SV40 early region genes, are insufficient for immortalization of human mesothelial and bronchial epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **213**:418–427.

De Vries JE, Dinjens WNM, De Bruyne GK, Verspaget HW., van der Linden EPM, de Bruine AP, Mareel MM, Bosman FT, ten Kate J (1995). *In vivo* and *in vitro* invasion in relation to phenotypic characteristics of human colorectal carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **71**:271–277.

Del Vecchio S, Stoppelli MP, Carriero MV, Fonti R, Massa O, Li PY, Botti G, Cerra M, d'Aiuto G, Esposito G, Salvatore M (1993). Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumours by *in vitro* quantitative autoradiography: Comparison with urokinase levels. *Cancer Res.* **53**:3198–3206.

Demers GW, Halbert CL, Galloway DA (1994). Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* **198**:169–174.

Dick JE (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat. Biotechnol.* **27**:44–46.

Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell Biol.* **20**:1436–1447.

Douglas JL, Quinlan MP (1994). Efficient nuclear localization of the Ad5 E1A 12S protein is necessary for immortalization but not cotransformation of primary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **5**:475–483.

Dowling P, Walsh N, Clynes M (2008). Membrane and membrane-associated proteins involved in the aggressive phenotype displayed by highly invasive cancer cells. *Proteomics* **8**:4054–4065.

Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P (1990). Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic market in breast cancer. *Cancer Res.* **50**:6827–6829.

Dulbecco R, Elkington J (1973). Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature* **246**:197–199.

Duncan EL, De Silva R, Reddel RR (1996). Immortalization of human mesothelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 239–258.

Eagle H, Foley GE, Koprowski H, Lazarus H, Levine EM, Adams RA (1970). Growth characteristics of virus-transformed cells. *J. Exp. Med.* **131**:863–879.

Easty DM, Easty GC (1974). Measurement of the ability of cells to infiltrate normal tissues *in vitro*. *Br. J. Cancer* **29**:36–49.

Edington KG, Berry IJ, O'Prey M, Burns JE, Clark LJ, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, Coggins LW, Parkinson EK (2004). Multistage head and neck squamous cell carcinoma. In PfragnerR, FreshneyRI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 261–288.

Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759–767.

Fenton JI, Hord NG (2004). Flavonoids promote cell migration in nontumorigenic colon epithelial cells differing in Apc genotype: Implications of matrix metalloproteinase activity. *Nutr. Cancer.* **48**:182–188.

Folkman J (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* **3**:65–71.

Fontana A, Hengarner H, de Tribolet N, Weber E (1984). Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. *J. Immunol.* **132**(4):1837–1844.

Frame M, Norman J (2008). A tal(in) of cell spreading. *Nat. Cell Biol.* **10**:1017–1019.

Frame MC, Freshney RI, Vaughan PET, Graham DI, Shaw R (1984). Interrelationship between differentiation and malignancy-associated properties in glioma. *Br. J. Cancer* **49**:269–280.

Freedman VH, Shin S (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* **3**:355–359.

Freshney RI, Hart E (1982). Clonogenicity of human glia in suspension. *Br. J. Cancer* **46**:463.

Freshney RI, Morgan D, Hassanzadah M, Shaw R, Frame M (1980a). Glucocorticoids, proliferation and the cell surface. In RichardsRJ, RajanKT (eds.), *Tissue culture in medical research (II)*. Oxford, UK: Pergamon Press, pp. 125–132.

Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D (1980b). Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. *Br. J. Cancer* **41**:857–866.

Ganmore I, Smooha G, Izraeli S (2009). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum. Mol. Genet.* **18**(R1):R84–R93.

Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJ (1974). Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" mice; II: Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**:921.

Glimelius B, Norling B, Westermark B, Wasteson A (1979). A comparative study of glycosaminoglycans in cultures of human, normal and malignant glial cells. *J. Cell Physiol.* **98**:527–537.

Goldstein S, Murano S, Benes H, Moerman EJ, Jones RA, Thweatt R (1989). Studies on the molecular genetic basis of replicative senescence in Werner syndrome and normal fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **24**(5–6):461–468.

Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G (2008). The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J. Cell. Biochem.* **103**:408–412.

Greider CW, Blackburn EH (1996). Telomeres, telomerase, and cancer. *Sci. Am.* **274**:92–97.

Guner M, Freshney RI, Morgan D, Freshney MG, Thomas DGT, Graham DI (1977). Effects of dexamethasone and betamethasone on *in vitro* cultures from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **35**:439–447.

Halleux C, Schneider Y-J (1994). Iron absorption by Caco-2 cells cultivated in serum-free medium as in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cell. Physiol.* **158**:17–28.

Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**:461–463.

Hart IR, Fidler IJ (1978). An *in vitro* quantitative assay for tumor cell invasion. *Cancer Res.* **38**:3218–3224.

Hasegawa K, Pomeroy JE, Pera MF. (2010). Current technology for the derivation of pluripotent stem cell lines from human embryos. *Cell Stem Cell* **6**:521–531.

Hince TA, Roscoe JP (1980). Differences in pattern and level of plasminogen activator production between a cloned cell line from an ethylnitrosourea-induced glioma and one from normal adult rat brain. *J. Cell. Physiol.* **104**:199–207.

Hirschi KK, Li S, Roy K. (2014). Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16:** 277–294.

Holt SE, Shay JW, Wright WE (1996). Refining the telomere–telomerase hypothesis of ageing and cancer. *Nat. Biotechnol.* **14**:836–839.

Hu G-F, Riordan JF, Vallee BL (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:204–209.

Huschtscha LI, Holliday R (1983). Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J. Cell Sci.* **63**:77–99.

Hynes RO (1973). Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3170–3174.

Inokuchi S, Handa H, Imai T, Makuuchi H, Kidokoro M, Tohya H, Aizawa S, Shimamura K, Ueyama Y, Mitomi T, Sawada Y (1995). Immortalisation of human oesophageal epithelial cells by a recombinant SV40 adenovirus vector. *Br. J. Cancer* **71**:819–825.

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP. (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat. Genet.* **21**:111–114.

Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell Physiol.* **173**:211–215.

Kahn P, Shin S-L (1979). Cellular tumorigenicity in nude mice: Test of association among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. *J. Cell Biol.* **82**:1.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**:312–318.

Kopper L, Hajdu M (2004). Tumor stem cells. *Pathol. Oncol. Res.* **10**:69–73.

Krueger SA, Wilson GD (2011). Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods Mol. Biol.* **731**:359–370.

Laferte S, Loh LC (1992). Characterization of a family of structurally related glycoproteins expressing beta 1-6-branched asparagine-linked oligosaccharides in human colon carcinoma cells. *Biochem. J.* **283**:192–201.

Lamb RF, Hennigan RF, Katsanakis KD, Turnbull K, MacKenzie ED, Birnie GD, Ozanne BW (1997). AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor, CD44. *Mol. Cell Biol.* **17**:963–976.

Laug WE, Tokes ZA, Benedict WF, Sorgente N (1980). Anchorage independent growth and plasminogen activator production by bovine endothelial cells. *J. Cell Biol.* **84**:281–293.

Le Poole IC, van den Berg FM, van den Wijngaard RM, Galloway DA, van Amstel PJ, Buffing AA, Smiths HL, Westerhof W, Das PK (1997). Generation of a human melanocyte cell line by introduction of HPV16 E6 and E7 genes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:42–49.

Lebeau MM, Rowley JD (1984). Heritable fragile sites in cancer. *Nature* **308**:607–608.

Lechardeur D, Schwartz B, Paulin D, Scherman D (1995). Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp. Cell Res.* **220**:161–170.

Liotta L (1987). The role of cellular proteases and their inhibitors in invasion and metastasis: Introductionary overview. *Cancer Metast. Rev.* **9**:285–287.

Lipscomb EA, Mercurio AM (2005). Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4integrin underlies its contribution to carcinoma progression. *Cancer Metast. Rev.* **24**:413–423.

Macleod RA, Kaufmann M, Drexler HG (2011). Cytogenetic analysis of cancer cell lines. *Methods Mol. Biol.* **731**:57–78.

Macpherson, I., & Montagnier, L. (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**:291–294.

Mahdavi V, Hynes RO (1979). Proteolytic enzymes in normal and transformed cells. *Biochim. Biophys. Acta* **583**:167–178.

Mareel M, Kint J, Meyvisch C (1979). Methods of study of the inva-

sion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart *in vitro*. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **30**:95–111.

Mark J (1971). Chromosomal characteristics of neurogenic tumours in adults. *Hereditas* **68**:61–100.

Markovitz D, Goff S, Bank A (1988a). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62**:1120–1124.

Markowitz D, Goff S, Bank A (1988b). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* **167**:400–406.

Markus G, Takita H, Camiolo SM, Corsanti J, Evers JL, Hobika JH (1980). Content and characterization of plasminogen activators in human lung tumours and normal lung tissue. *Cancer Res.* **40**:841–848.

Mayne LV, Price TNC, Moorwood K, Burke JF (1996). Development of immortal human fibroblast cell lines. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 77–93.

Mayne LV, Priestly A, James MR, Burke JF (1986). Efficient immortalisation and morphological transformation of human fibroblasts with SV40 DNA linked to a dominant marker. *Exp. Cell Res.* **162**:530–538.

Meeker AK, De Marzo AM (2004). Recent advances in telomere biology: Implications for human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **16**:32–38.

Mege RM, Matsuzaki F, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA, Edelman GM (1989). Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7274–7278.

Ment LR, Stewart WB, Scaramuzzino D, Madri JA (1997). An *in vitro* three-dimensional coculture model of cerebral microvascular angiogenesis and differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:684–691.

Metcalf D (1990). The colony stimulating factors. *Cancer* **65**:2185–2195.

Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **65**:2220–2224.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds.) (2009). *Mitelman database of chromosome aberrations in cancer* (http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman).

Montagnier L (1968). Correlation entre la transformation des cellule BHK21 et leur resistance aux polysaccharides acides en milieu gélifié. *C. R. Acad. Sci. D* **267**:921–924.

Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967). Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**:519–524.

Murnane JP (2006). Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair (Amsterdam)* **5**:1082–1092.

Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **11**: 503–511.

Nehls V, Drenckhahn D (1995). A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res.* **50**:311–322.

Neugut AI, Weinstein IB (1979). Use of agarose in the determination of anchorage-independent growth. *In Vitro* **15**:351.

Nicolson GL (1976). Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells; II: Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* **458**:1–72.

Nishizuka S, Winokur ST, Simon M, Martin J, Tsujimoto H, Stanbridge EJ (2001). Oligonucleotide microarray expression analysis of genes whose expression is correlated with tumorigenic and non-tumorigenic phenotype of HeLa x human fibroblast hybrid cells. *Cancer Lett.* **165**:201–209.

Noble M, Barnett SC (1996). Production and growth of conditionally immortal primary glial cell cultures and cell lines. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 331–366.

Nowell PC, Hungerford DA (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**:85–109.

Patel K, Moore SE, Dickinson G, Rossell RJ, Beverley PC, Kemshead JT, Walsh FS (1989). Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognised by monoclonal antibodies of similar specificity in small-cell lung carcinoma and neuroblastoma. *Int. J. Cancer* **44**:573–578.

Peehl DM, Stanbridge EJ (1981). Anchorage-independent growth of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3053–3057.

Pereira-Smith O, Smith J (1988). Genetic analysis of indefinite division in human cells: Identification of four complementation groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6042–6046.

Persad S, Dedhar S (2003). The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metast. Rev.* **22**:375–384.

Peters DM, Dowd N, Brandt C, Compton T (1996). Human papilloma virus E6/E7 genes can expand the lifespan of human corneal fibroblasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:279–284.

Pinto D, Clevers H (2005). Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol. Cell.* **97**:185–196.

Pitot H, Periano C, Morse P, Potter VR (1964). Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vitro. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **13**:229–245.

Pretlow TG, Delmoro CM, Dilley GG, Spadafora CG, Pretlow TP (1991). Transplantation of human prostatic carcinoma into nude mice in Matrigel. *Cancer Res.* **51**:3814–3817.

Punchard N, Watson D, Thomson R, Shaw M (1996). Production of immortal human umbilical vein endothelial cells. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 203–238.

Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A (1986). Carcinogen specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* **322**:78–79.

Reddel RR (2000). The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**:477–484.

Reeves ME (1992). A metastatic tumour cell line has greatly reduced levels of a specific homotypic cell adhesion molecule activity. *Cancer Res.* **52**:1546–1552.

Repesh LA (1989). A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. *Invas. Metast.* **9**:192–208.

Richmond A, Lawson DH, Nixon DW, Chawla RK (1985). Characterization of autostimulatory and transforming growth factors from human melanoma cells. *Cancer Res.* **45**:6390–6394.

Rundlett SE, Gordon DA, Miesfeld RL (1992). Characterisation of a panel of rat ventral prostate epithelial cell lines immortalized in the presence or absence of androgens. *Exp. Cell Res.* **203**:214–221.

Russo J, Calaf G, Russo IH (1993). A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit. Rev. Oncogen.* **4**(4):403–417.

Rygaard K, Moller C, Bock E, Spang-Thomsen M (1992). Expression of cadherin and NCAM in human small cell lung cancer cell lines and xenografts. *Br. J. Cancer* **65**:573–577.

Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T (2011) Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. *Hum. Cell* **24**(1):2–8.

Sasaki M, Honda T, Yamada H, Wake N, Barrett JC (1996). Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res.* **54**:6090–6093.

Schlechte W, Brattain M, Boyd D (1990). Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cells: Dependence on urokinase receptor display. *Cancer Commun.* **2**:173–179.

Schwartz Albiez R, Heidtmann H-H, Wolf D, Schirrmacher V, Moldenhauer G (1991). Three types of human lung tumour cell lines can be distinguished according to surface expression of endogenous urokinase and their capacity to bind exogenous uroki-

nase. *Br. J. Cancer* **65**:51–57.

Seigel GA (1996). Establishment of an E1a-immortalised retinal cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:66–68.

Selby PJ, Thomas MJ, Monaghan P, Sloane J, Peckham MJ (1980). Human tumour xenografts established and serially transplanted in mice immunologically deprived by thymectomy, cytosine arabinoside and whole-body irradiation. *Br. J. Cancer* **41**:52.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593–602.

Shay JW, Wright WE (1989). Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T antigen. *Exp. Cell Res.* **184**:109–118.

Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, der Haegen A (1993). E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* **8**:1407–1413.

Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* **20**:592–596.

Skobe M, Fusenig NE (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1–6.

Smith S, de Lange T (1997). TRFI, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet.* **113**:21–26.

Southern PJ, Berg P (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327–341.

Steinberg ML (1996). Immortalization of human epidermal keratinocytes by SV40. In FreshneyRI, FreshneyMG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 95–120.

Strickland S, Beers WH (1976). Studies on the role of plasminogen activator in ovulation: *In vitro* response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* **251**:5694–5702.

Su X, Sorenson CM, Sheibani N (2003). Isolation and characterization of murine retinal endothelial cells. *Mol. Vision* **1**:171–178.

Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y (2004). Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res.* **64**:3361–3364.

Temin HM (1966). Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses; III: The differential effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and converted cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **37**:167–175.

Thomas S, Gray E, Robinson CJ (1997). Response of HUVEC and EAhy926 and fibroblast growth factors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:492–494.

Todaro GJ, DeLarco IE (1978). Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res.* **38**:4147–4154.

Todaro GJ, Green H (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**:299–313.

Toouli CD, Huschtscha LI, Neumann AA, Noble JR, Colgin LM, Hukku B, Reddel RR (2002). Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene* **21**(1):128–139.

Tsao S-W, Mok SC, Fey EG, Fletcher JA, Wan TSK, Chew E-C, Muto MG, Knapp RC, Berkowitz RS (1995). Characterisation of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp. Cell Res.* **218**:499–507.

Unkless I, Dano K, Kellerman G, Reich E (1974). Fibrinolysis associated with oncogenic transformation: Partial purification and characterization of cell factor, a plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **249**:4295–4305.

Vaheri A, Ruoslahti E, Westermark B, Pontén J (1976). A common cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: Loss in malignant cells. *J. Exp. Med.* **143**:64–72.

Vanhoecke B, Derycke L, Van Marck V, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M (2005). Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (Humulus lupulus L.*) and beer. Int. J. Cancer* **117**:889–895.

Vaziri H, Benchimol S (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life-span. *Curr. Biol.* **8**:279–282.

Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* **323**:644–648.

Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP (2008). Cancer stem cells–old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* **15**:947–958.

Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG (2004). Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci. Rep.* **24**(6):631–639.

Whur P, Magudia M, Boston I, Lockwood J, Williams DC (1980). Plasminogen activator in cultured Lewis lung carcinoma cells measured by chromogenic substrate assay. *Br. J. Cancer* **42**:305–312.

Wootton M, Steeghs K, Watt D, Munro J, Gordon K, Ireland H, Morrison V, Behan W, Parkinson EK (2003). Telomerase alone extends the replicative lifespan of human skeletal muscle cells without compromising genomic stability. *Hum. Gene Ther.* **14**: 1473–1487.

Wurster-Hill D, Cannizzaro LA, Pettengill OS, Sorenson GD, Cate CC, Maurer LH (1984). Cytogenetics of small cell carcinoma of the lung. *Cancer Genet. Cytogenet.* **13**:303–330.

Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: Polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**:635–647.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I., Richardson A, Weinberg RA (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**:927–939.

Yew A, Trang A, Nagasawa DT, Spasic M, Choy W, Garcia HM, Yang I (2013). Chromosomal alterations, prognostic factors, and targeted molecular therapies for malignant meningiomas. *J. Clin. Neurosci.* **20**(1):17–22.

Zhang X, Jiang G, Cai Y, Monkley SJ, Critchley DR, Sheetz MP (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.* **10**:1062–1068.

（钱晓菁　译）

第23章

定　量

对不同细胞系的生长特性进行描述、开展实验分析，以及建立可重复的培养条件来保证原代培养和细胞系培养的一致性（参见12.4节和12.5节），均需要对细胞培养进行定量分析。由于是在无菌条件下工作，并且要尽可能减少培养细胞在培养箱外暴露的时间，因此在某种程度上需要在速度和准确性之间进行折中。虽然原代培养和普通培养需要用定量的方法来保证可重复性，但是处理速度对于维持细胞较好的生存和生长都很关键，因此，在这些情况下，可以降低准确性，如在移液的时候迅速完成操作。然而，在实验条件下，即便需要稍微减慢操作的速度，也必须保证准确性。虽然在常规培养时可以接受约10%的误差，但在实验条件下，误差应该低很多。

本章涉及细胞计数技术，以及其他一些用于定量细胞增殖的分析方法和检测细胞体积的其他基本方法，如DNA和蛋白质估算、对阳性或阴性刺激的反应。与细胞毒性和细胞存活相关的检测则分别描述（参见24.1节）。

23.1 细胞计数

虽然可以通过在显微镜下观察形态来估算细胞生长阶段，但是实现培养条件的标准化，以及对合适的定量实验进行分析和重复很难，特别是实验当中进行细胞计数，除非是在每次实验前后进行。判断细胞数量的方法有很多，有直接的（如血细胞计数器、电子计数器和流式细胞仪），也有间接的（如结晶紫染色或随代谢降低的MTT）（表23.1）。

表23.1　细胞数量的测定

	方法	优点	缺点
直接			
血细胞计数板	在显微镜下计数标记的计数板上给定区域的细胞数量，由此推断悬液中的细胞数量	价格便宜；可以看到细胞团块等；可以采用活性染料	统计误差较大；缓慢，敏感性低
基于阻抗的电子颗粒计数器	在等渗盐水中稀释细胞样品，在预设的程序下计数细胞。这是基于细胞通过狭窄孔口时，电阻会发生变化	快速进行大量样品计数，误差低 样品大小不可控制	"盲目"；死细胞、活细胞和团块都计算在内；细胞浓度高时，有重合信号；孔口易堵塞

续表

	方法	优点	缺点
成像分析	在特定的计数小室中，扫描显微镜视野中染色和未染色的细胞	与血细胞计数板的原理相同，但更为快速和准确，在监视器上细胞可见	需要单细胞悬液
流式细胞仪	利用散射光计数，固定或不固定的细胞群体均可；可用DNA荧光染色	许多指数可以同时测定	需要单个细胞悬液，技术上更为复杂
间接			
MTT分析（见方案24.4）	用MTT染色活细胞，然后用DMSO溶解，在ELISA读数板上读数	快速；已经自动化；只检测活细胞	MTT甲臜吸光值可发生改变
磺胺邻二甲氧嘧啶	染色固定的细胞，在荧光读数板上读数	敏感性好，操作简单	染色死细胞；需要荧光
结晶紫染色	用CV染色固定的细胞，然后溶解在乙醇中	便宜，操作简单	探测器 染色死细胞
考马斯亮蓝染色	用考马斯亮蓝染色，然后在ELISA上读数	快速，已经自动化	计数所有的细胞（甚至所有的蛋白质）

23.1.1 血细胞计数器

细胞悬液的浓度可以通过将细胞放置在显微镜下无深浅反差的小室中观察得出（图 23.1）。计数已知深度的特定面积（如体积确定）中的细胞数量，然后就可以得出细胞浓度。

在训练中，可以适当修改方案23.1中列出的方法（参见27.3节练习11）。

方案23.1 利用血细胞计数器进行细胞计数

概要

胰蛋白酶消化单层培养细胞，或采用悬浮培养的细胞，准备好血细胞计数板，将细胞加入到计数孔中。在显微镜下计数细胞，并计算细胞浓度。

材料

无菌

- D-PBSA
- 天然胰蛋白酶，0.25%
- 生长培养基
- 黄色移液器枪尖

非无菌

- 移液器，20μL 或 100μL，刻度可调节

- 血细胞计数器（改良的纽巴氏）
- 检尺计数器
- 显微镜，最好带相差镜头

操作步骤

A. 从贴壁细胞准备样品

1. 按照常规传代的方法，消化单层细胞（参见方案12.3），将细胞重悬，使浓度约达到1×10^6个/mL。生长实验中，需要计数细胞时，无需去掉胰蛋白酶，可以在消化液中将细胞打散，然后直接计数。如果细胞容易再聚集，可以在计数之前按照50∶50的比例用含有血清的培养基稀释。

2. 充分混匀悬液，使细胞分散开，然后取少量悬液（约1mL）加入到小瓶或普通容器中。

B. 从悬浮培养细胞准备样品

1. 充分混匀悬液，使细胞团块分散开。

2. 取1mL悬液加入到小瓶或普通容器中。

该方案需要的细胞量最少是1×10^6个/mL，所以细胞悬液可能需要先进行离心（100*g*，2min），然后再用稍少量确定体积的液体重悬。

C. 准备计数板

1. 用70%乙醇清洁计数板表面，注意不要划伤半镀银的包被。

2. 清洁盖玻片，将边缘轻轻润湿，然后按压到凹槽和半镀银包被的区域（图23.1a~c），盖玻片的边缘要盖住最外边的凹槽。交界面呈现的样式（牛顿环-盖玻片和计数板之间出现彩虹的颜色，像油在水面上形成的环一样）提示盖玻片平整地盖到计数板上了，由此可以计算出计数小室的深度。

3. 充分混匀细胞样品，用力吹打，使细胞团块散开，然后用移液器吸取20μL。

4. 将细胞悬液立即转移到血细胞计数器小室的边缘，排出悬液，通过毛细管作用吸入到盖玻片的下方。往小室中注入的液体不要太多，也不要太少，否则由于表面张力的变化会改变小室的容积。液体到凹槽的边缘即可。

5. 如果血细胞计数器上另一个小室未使用，可以再次混匀细胞悬液，吸取液体后加入到该小室中。

6. 去除多余的液体（不要吸走盖玻片下方的液体），然后将计数板置于显微镜下。

7. 选择10倍物镜，聚焦在小室的网格线上（图23.1f~h）。如果没有相差显微镜，或者由于相差不好，难以聚焦，可以调低视野虹膜，或通过补偿聚光器使光线稍微变暗。

8. 移动计数板，保证所见视野为网格的中心区域，而且是由三条平行线界定的最大的可见区域。该区域面积为$1mm^2$。在标准的10倍物镜中，该区域几乎可以占据整个视野，或者根据观察的视野不同，边缘处会稍微偏离视野（参见图23.1f）。

9. 计数该区域中的细胞，可以利用亚分区（同样由3条平行线分割）和单条网格线来帮助计数。计数每个小方格中位于上方和左侧线上的细胞，而位于底部或右侧线上的细胞则不计，从而避免重复计数细胞。常规传代中，可以计数的细胞是100~300，计数的细胞越多越准确。对于更为精确的定量实验，应该计数的细胞数量是500~1000。

10. 如果细胞数量很少（<100个/mm^2），计数中央方格周边的一个或多个小方格（每个小方格$1mm^2$）（图23.2）。

11. 如果细胞数量太多（>1000个/mm^2），只需计数穿过较大方格（$1mm^2$）对角线的5个小方格（每个小方格$0.04mm^2$，由3条平行线分割），总面积为$0.2mm^2$。

12．如果计数板有两个小室，使用第二个小室，再做一次计数；如果没有，则冲洗计数板，使用新的样品重复计数。

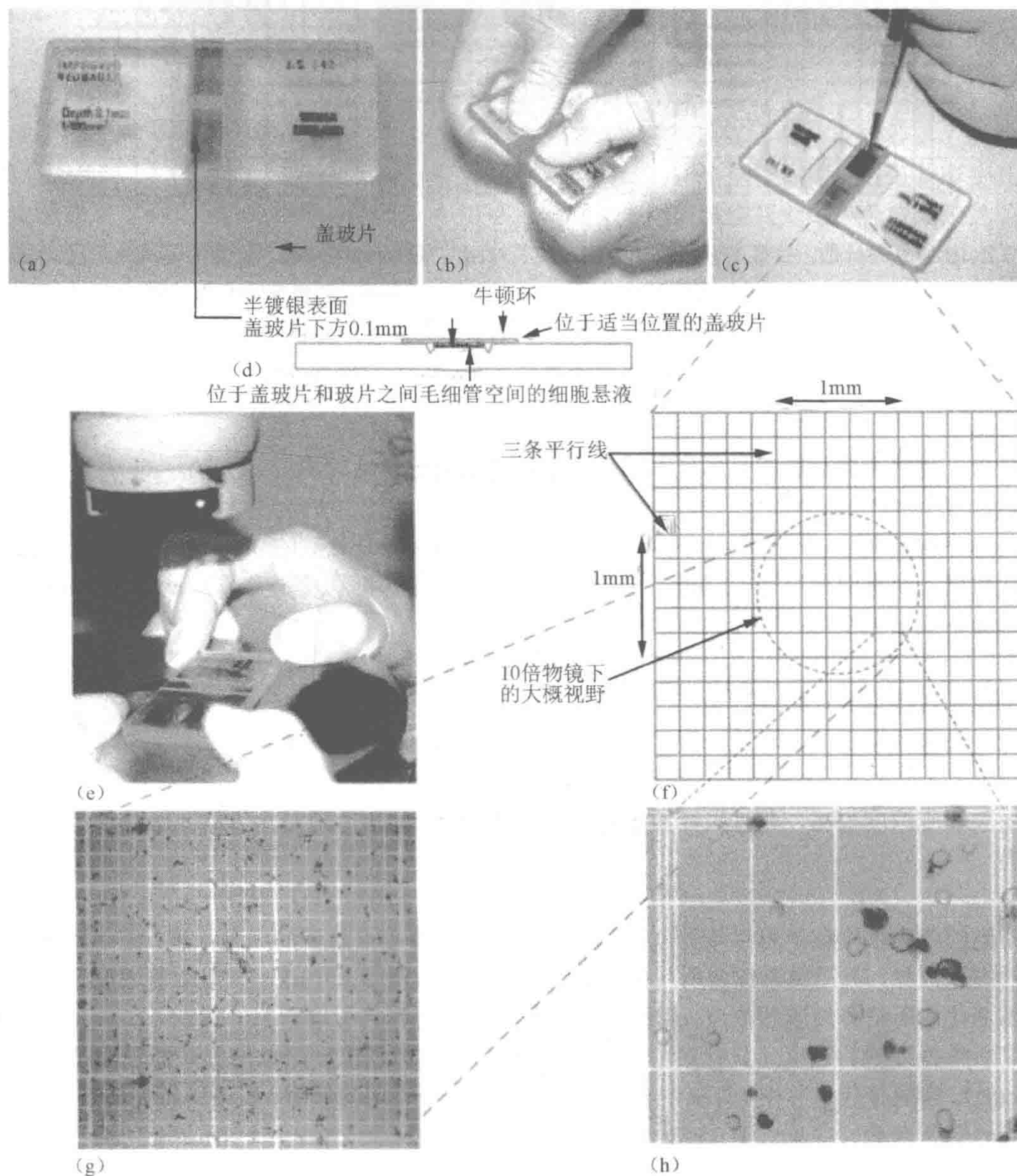


图 23.1 血细胞计数板的使用。(a) 使用前的血细胞计数器玻片（改良的纽巴氏）和盖玻片；(b) 将盖玻片按压到玻片上；(c) 将细胞悬液加入到安放好的玻片上；(d) 玻片的纵切面，显示细胞样品位于一个 0.1mm 深的小室中；(e) 在显微镜下观察玻片；(f) 网格整个区域的放大视野。中央区域中，由点状环圈起来的部分是在常用的 10 倍物镜下观察到的区域。这一区域占据网格中央大概 1mm×1mm 方格；(g) 低倍（10 倍物镜）显微照片显示玻片上 25 个 200μm×200μm 的更小的方格，这些方格占据中央 1mm×1mm 方格，上面加有用萘黑（胺黑）预处理的细胞；(h) 高倍（40 倍物镜）显微照片显示其中一个较小的 200μm 方格，由 3 条平行线分割，并且含有 16 个最小（50μm×50μm）的方格。活性细胞未被染色，而且很清楚，边缘有一个折射环；非活性细胞是黑色的，而且没有折射环

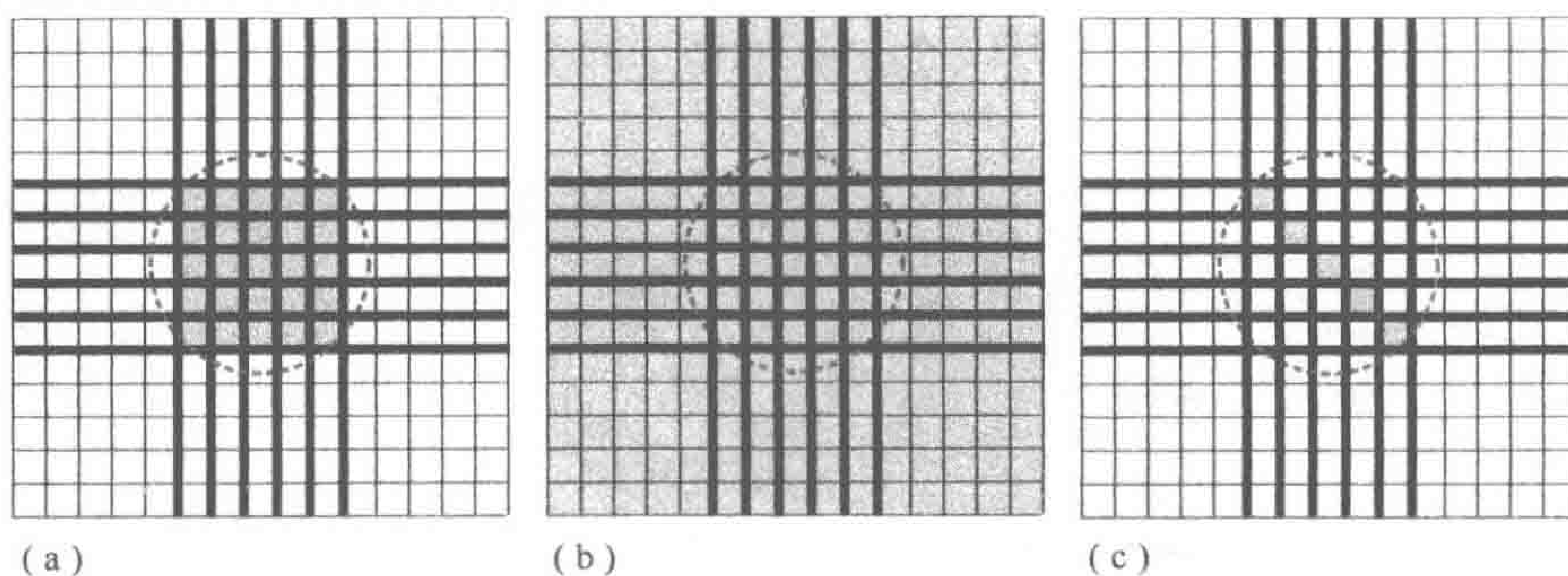


图 23.2 挑选视野计数。计数某一区域的细胞，使其细胞数目介于 200~500。计数的区域为灰色。（a）预计细胞数目在 2×10^6~1×10^7 个/mL 时，计数中间的 25 个方格（$1mm^2$）然后乘以 10^4；（b）细胞浓度低时，计数整个网格（$9mm^2$）然后乘以 1111（或者除以 9，然后乘以 1×10^4）；（c）细胞浓度高时，计数最小的 5 个方格（每个 $0.04mm^2$，共 $0.2mm^2$），最好是在对角线上排列的方格，然后乘以 5×10^4

分析 计算两次计数的平均值，然后用下列公式得出样品的浓度

$$c=n/v$$

式中，c 是细胞浓度（个/mL）；n 是计数得到的细胞数量；v 是计数的体积（mL）。对于改良的纽巴氏计数板，小室的深度是 0.1mm，假定中央的 $1mm^2$ 全部被利用了，那么 v 是 $0.1mm^3$，或者 $1\times10^{-4}mL$，则公式变为

$$c=n/10^{-4} \text{ 或 } c=n\times10^4$$

也就是说将你的计数乘以 10 000。

如果细胞浓度很低，并且计数了 9 个 $1mm^2$ 的小方格，则公式变为

$$c=n\times10^4/9 \text{ 或 } c=n\times1.1\times10^3$$

如果细胞浓度很高，并且只计数了中央 $1mm^2$ 区域内的 5 个对角小方格（即总共 1/5），则公式变为

$$c=n\times5\times10^4$$

得到的细胞浓度就是悬浮培养或胰蛋白酶消化后或离心重悬后的细胞浓度。要计算每个培养瓶中的细胞数量，就用重悬细胞所用的培养基的体积（本例中是 1mL）乘以细胞浓度。要计算胰蛋白酶消化前所培养细胞的浓度，用细胞浓度除以最初培养瓶中培养基的体积（本例中是 5mL）。要计算所培养细胞的密度（只针对单层培养的细胞），用细胞密度除以培养瓶的表面积（本例中是 $25cm^2$）。常规传代培养中，每瓶中含有的细胞数目是最有用的数字，而描绘生长曲线时，个/mL 和个/cm^2 更为合适（参见方案 23.7、方案 23.8）。

血细胞计数板计数很便宜，而且可以看到正在计数的细胞。如果细胞之前与等体积的活性染料混合（参见方案 23.1，图 23.1g、h），则可同时检测细胞活力（注意要抵消因活性染料而额外稀释的计数液体，以便获得准确计数）。但是，用血细胞计数板计数很慢，在制备样品的方法和计数的细胞总数方面都容易出现误差，而且它要求细胞最少是 2×10^5 个/mL。

该操作中出现的大部分误差是由于制备样品不准确及向小室中转移细胞而引起的。制备样品时，一定要保证细胞悬液充分混匀，在将细胞转移到小室之前，不要让细胞沉下去或粘连到移液器的顶端。此外，要保证是单细胞悬液，因为细胞聚集物会导致计数不准确。较大的聚集物进入小室的速度很慢或者根本进不去。如果在制备细胞悬液的过程中，不能避免细胞聚集（表 12.5），则用含有 0.1%结晶紫的柠檬酸于 37℃裂解细胞 1h，然后计数细胞核（Sanford et al., 1951）。血细胞计数器还有一个很大的统计误差，特别是计数时每平方毫米少于 100 个细胞

（Hsiung et al.，2013）。

23.1.2 电子计数

自20世纪50年代后期首个基于阻抗的电子计数器出现以来，自动细胞计数器的设计方面已经出现了一些多样性。现在主要有3种类型（表23.2）：①最初的基于阻抗的计数器，例如，Z1和Z2（Beckman计数器），或者是CASY（Roche Diagnostics），这是根据细胞通过狭窄小孔时产生的电流会发生变化；②在特定计数小室中用可见光或荧光对显微镜视野中染色或未染色的细胞或细胞核进行影像分析，如Invitrogen Countess（Life Technologies）、Cellometer（Peqlab）或者Nucleopcounter（Chemometic）；③台式流式细胞仪，通过分析单细胞流可以获得细胞浓度和其他的参数，如Guava（EMD Millipore）和Accuri（BD Biosciences）。所有这些仪器在单细胞悬液时工作最好，对于3类，单细胞悬液是必需的，但对于1类和2类，允许有一定的补偿。还有影像分析器能够监测活细胞的生长，不需要破坏性取样（如Incucyte、Essen）。

表23.2 电子细胞计数器

名称	供应商	作用原理
Z1，Z2	Beckman Coulter	细胞通过小孔时电流阻抗发生变化
CASY	Roche Diagnostics	细胞通过小孔时电流阻抗发生变化
Cellomether	Nexcelom	对光室中的细胞进行荧光摄像（PI和其他），整个细胞和细胞碎片
NucleoCounter	Chemometec	荧光和可见光摄像（PI，台盼蓝），整个细胞和细胞碎片（核）
Countess	Life Technologies	成像分析±台盼蓝
Vi-CELL	Beckman Coulter	成像分析±台盼蓝
ADAM	Labtech International	荧光成像分析（PI）
Cedex2	Innovatis	成像分析±台盼蓝排出
Cellavista	Synentec	自动成像分析生长细胞
Incucte	Essen	自动成像分析生长细胞
ManuCyte	Chip-man	自动成像分析生长细胞
TC20	Bio-Rad	成像分析±台盼蓝
C6	Accuri	对单个细胞流进行流式分析；多个参数
CyFlow CCA	Partec	对单个细胞流进行流式分析；多个参数
Guava	Millipore	对单个细胞流进行流式分析；多个参数

基于阻抗的电子计数器 该电子细胞计数器有3个主要组成部分（图23.3）：①一个带有小孔的管道，小孔是150μm，与计量泵相连；②一个放大器，脉冲高度分析器和两个与电极相连的定标器，其中一个电极在小孔管中，另一个在样本烧杯中；③一个模拟数字读出器，显示细胞计数和其他一系列参数，如细胞容积和体积分布。

当计数开始后，一定量的细胞悬液通过小孔吸进去（图23.4）。随着每个细胞通过小孔，它改变了通过小孔的电流的阻抗，改变的数值与细胞的容积成比例。这一阻抗的变化会产生脉冲（amp^{-1}），该脉冲被放大并计数。由于脉冲的大小与通过小孔的细胞容积成比例，因此一系列变化的脉冲高度信号就产生了。设定的最低阈值（细胞直径）可以去除电子噪声和小的微粒状碎片，但保留由细胞产生的脉冲。最高阈值可根据模式不同，设为无限，或设为可调节。这些阈值决定计数哪个体积范围内的颗粒。计数器的显示器上出现了一个柱状图，描述细胞体积的分布。在某些情况下，

软件可以纠正细胞聚集和共发生（如两个或更多个细胞同时通过小孔）。

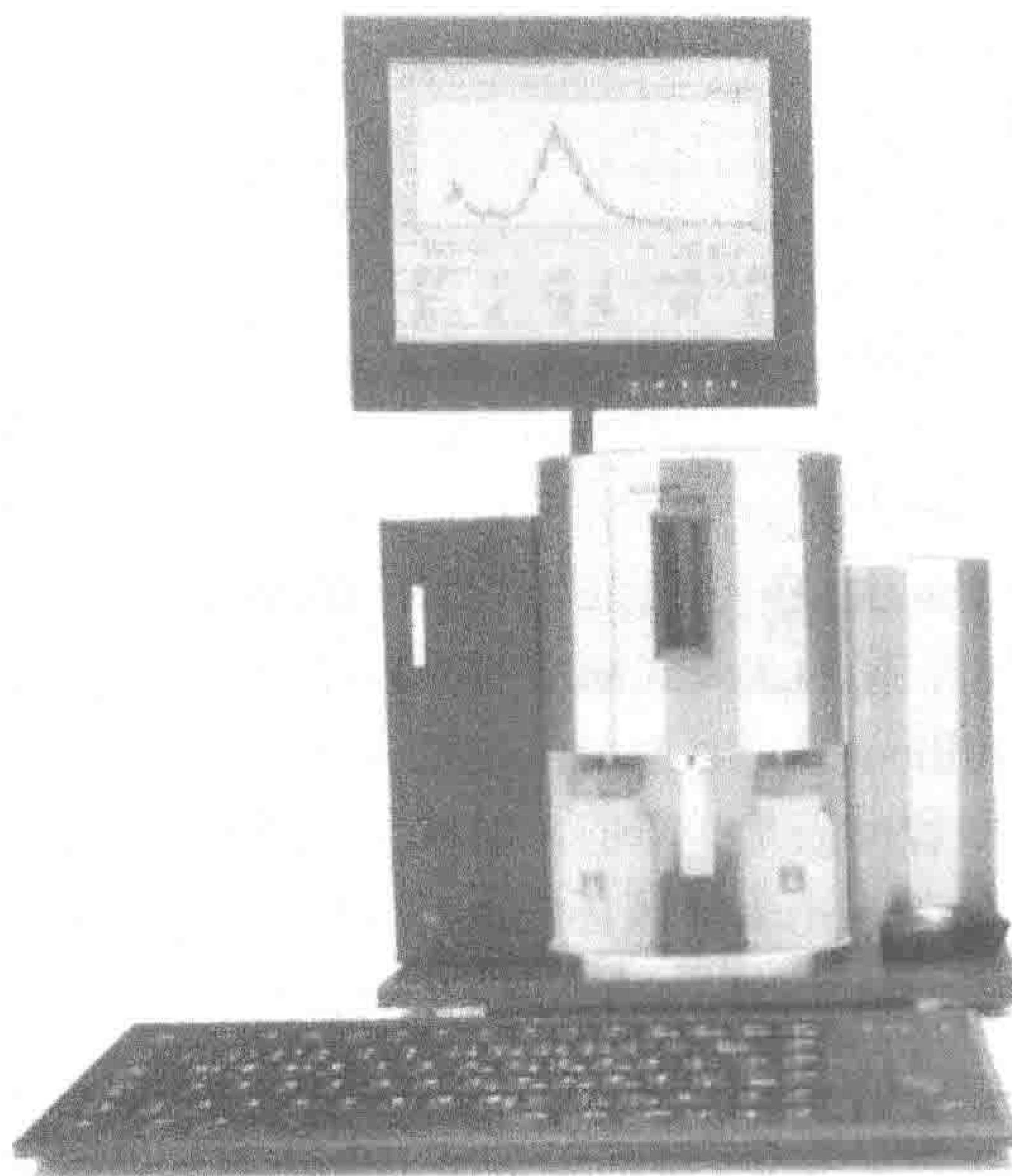


图 23.3 电子细胞计数器。基于阻抗的细胞计数器能够进行细胞计数和细胞体积测定。(a)CASY 1(Innovatis)细胞计数器，也可用于活细胞与非活性细胞、单个细胞与细胞聚集物的区分（承蒙 Schärfe Systems 提供）；(b) Beckman Coulter Z2 细胞计数器和细胞体积分析仪。Z1 稍便宜，但不能进行细胞体积分析（承蒙 Beckman Coulter 提供）

在练习时，方案 23.2 可以加以改动（参见 27.3 节练习 11）。

方案 23.2 基于阻抗的电子计数器

概要

在电极中稀释细胞样品（生理盐水或 D-PBSA），将稀释的样品置于小孔下方的管中，通过计数器吸取 0.5mL 稀释的样品来计数细胞。

材料

无菌或无菌制备

- 细胞培养物
- D-PBSA
- 0.25%粗制胰蛋白酶
- 生长培养基

非无菌

- 计数杯

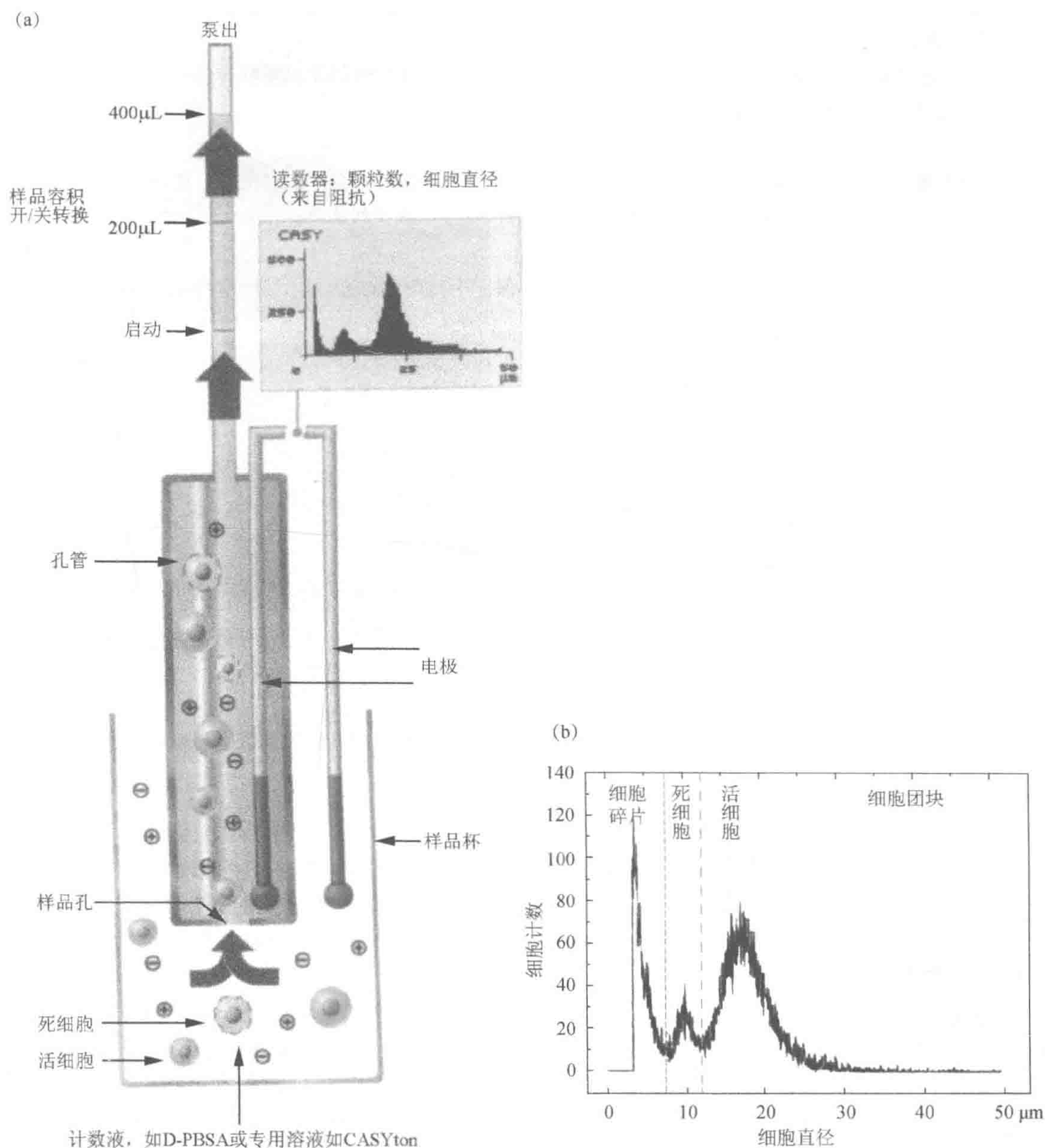


图 23.4 细胞计数器的操作。以 CASY 为例，操作基于阻抗的电子颗粒计数器原则。(a) 孔管中的电解液（如 D-PBSA）与泵相连，从烧杯中吸取固定容积的细胞样品。一个正在通过小孔的细胞改变了电流，生成一个信号，信号的高度与细胞的体积成比例（Schärfe Systems 馈赠）；(b) 细胞数目对比细胞直径可给出体积分布分析，允许设定较低的阈值（垂直虚线）。该展示中，上方阈值可以设定为 30μm 或者无限。垂直虚线之间的峰和垂直虚线代表死细胞，可在活细胞计数时使用以便判断存活比例（Schärfe Systems 数据馈赠）

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化单层细胞或收集悬浮培养的细胞样品。细胞必须充分混匀，成为单个细胞悬液

（参见方案23.1）。

2. 在25mL烧杯或一次性样品杯中，用20mL计数液按照1∶50的比例稀释样品细胞悬液。自动分配器（图4.6）会加速稀释并改进可重复性。

注意事项 迅速分配计数液会产生气泡，这些气泡通过小孔时也会计数。所以，在计数前计数液应当静置一会。如果先分配液体，然后加入细胞，这一问题可以减少到最小。

3. 充分混匀悬液，然后置于孔管顶端的下方，保证小孔是覆盖的，并且外电极位于样品烧杯中计数液的下方。

4. 检查程序设置：

(a) 阈值设定（最小细胞体积，通常是7.0μm）。

(b) 计数的容积（通常是0.4mL）。

(c) 背景减除（如果需要的话）。

(d) 稀释设置（例如，如果在20mL D-PBSA中计数0.4mL，则设为50）。

5. 检查可见的模拟显示：

(a) 保证所有细胞都在设定的阈值之内。

(b) 检查细胞活性或细胞碎片（表现为曲线上出现侧翼，或者柱状图落在设定的正常最低阈值之下）。

(c) 检查聚集物（表现为出现在正常体积范围上方的颗粒）。

6. 启动计数顺序。

7. 当计数周期结束时，体积分布会出现在模拟屏幕上（图23.4）。转换到数字屏幕会显示每毫升中的细胞计数。

分析 如果背景和稀释设置都正确，则细胞浓度就是计数液稀释之前的初始悬液中的细胞浓度。否则，如果计数器的设置是0.5mL，1∶50稀释，那么读出器上的最终读数应当乘以100，才是最初细胞悬液中的细胞浓度（个细胞/mL）。不过，一些计数器会自动补偿采样的容积，所以要检查仪器手册。

计算 以前的计数器要求计算，就是通过增加最低阈值的增量来计数细胞（最高阈值设为无限）。这些计数图产生平顶，平顶的中央可以给出正确的阈值设定。现代计数器有模拟显示，可在读出器上手动设定最低阈值，通常是7.0μm，而最高阈值设为30μm或无限。将最低阈值设为7.0μm会包含非活性细胞，而高一点的设定（图23.4是12μm）则会排除大部分非活性细胞。非活性细胞的外观直径更小，因为胞质膜是漏的，细胞质和电解液具有相同的阻抗，并且阻抗信号是由细胞核产生的。30μm及以上的计数提示有聚集物；聚集物可以通过设定合适的最高阈值来部分去除（如图23.4中设为25μm或30μm），也可以用计数器操作程序中带有的统计计算来补偿。

成像分析计数细胞 采用影像分析来扫描光学计数小室中的细胞，通过识别台盼蓝染色（如计数器Vi-CELL）或在某些模式下碘化丙啶的荧光（PI；如ADAM、Labtech）来区分活细胞和死细胞。这些可在显示器上观察到。大部分计数器也可以生成细胞体积分布的模拟图，可以据此设定最高和最低阈值（图23.5）。将细胞样品，通常是20μL~1mL，注入小室中，然后放入计数器。对于用台盼蓝处理的细胞，可以使用的细胞浓度范围为5×10^4~1×10^7个/mL；对于用碘化丙啶处理的细胞，可以使用的细胞浓度最低为5×10^3个/mL。设定好正确的阈值后，计数大概需要30s。使用碘化丙啶的计数器（如细胞核计数器）也可以通过未处理细胞碘化丙啶的摄入量与同一样品中裂解细胞的碘化丙啶摄入量的比值来判断细胞活性。

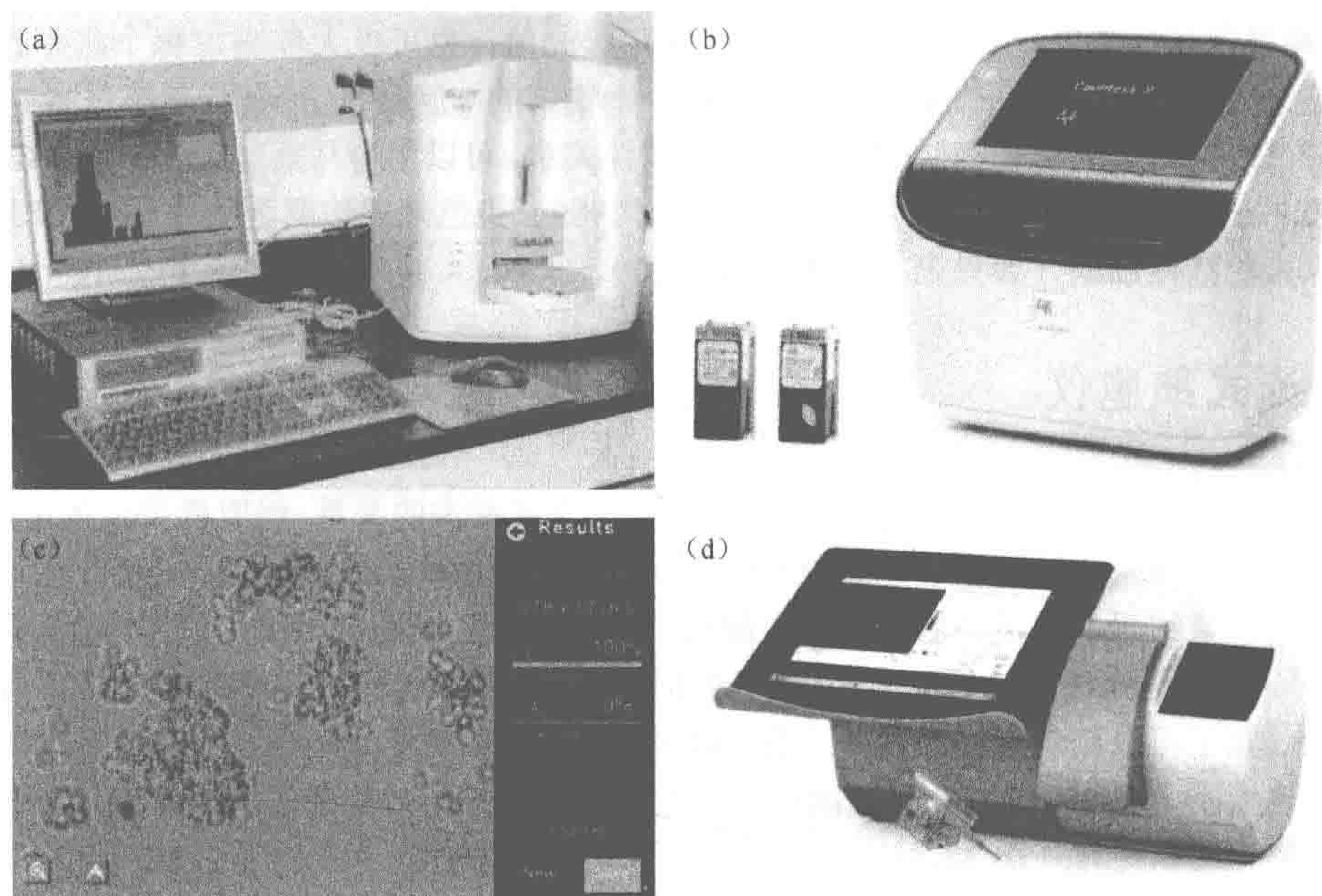


图 23.5 细胞计数器成像分析。（a）Vi-CELL（Beckman Counlter）。未稀释的细胞悬液加入到样品支架上的小杯子内，由计数器（右侧）取样，与台盼蓝混合，然后在流槽中分析。输出显示在显示器上（左侧），可以是显示细胞体积分布的图表，也可以是活细胞为绿色、死细胞为红色的细胞显微镜视野（承蒙 ATCC 提供）；（b）Countess FL（Life Technologies）带有附属荧光过滤器；（c）屏幕显示正在计数哪些细胞，注意这些是聚集的 3T3，但仍然可显示单个细胞（承蒙 Thermo Fisher 提供）；（d）Nucleocounter NC-200（Innovatis）在单细胞流中计数吖啶橙（AO）和 DAPI 染色的细胞。AO 染色所有细胞，DAPI 只染色死细胞的细胞核，可以给出整体细胞计数和存活情况。细胞样品盒位于前方（承蒙 Chemometec 提供）

通过对培养瓶、皮氏培养皿或多孔培养板（Incucyte、Chip-Man ManuCyte）中生长的单层细胞进行成像分析，也可以对活的培养物进行持续监测。这些体系通过计数细胞或测定剩余可生长区域来工作，并且可以持续输出数字数据或显微镜影像，能够用于生成生长曲线或延时影片（参见 23.9.3 节）。

电子细胞计数很快速，而且固有误差小，因为它计数的细胞数目很大。虽然由于细胞聚集物、死细胞和位于正确体积范围内的碎片颗粒会被计数在内，导致阻抗计数容易出现误判，但是，这可以通过去除死细胞和细胞聚集物来进行纠正，CASY 可以通过适当的程序来修正聚集物。细胞悬液在稀释之前和在阻抗计数器上读数之前都要仔细检查，采用影像分析的计数器可以给出计数细胞悬液的视觉显示。总体来讲，流式细胞仪设置稍微复杂，但可以测量更多的参数（参见 17.3.2 节、23.7.2 节），它们通常指定用于常规细胞计数。电子细胞计数器很昂贵，但如果使用正确则非常方便，而且细胞计数更快、更准确。

23.1.3 染色的单层细胞

有些情况下细胞不能收集起来计数或者悬液中计数的细胞太少（如定量板中细胞浓度很低）。在这些情况下，细胞可以固定起来，原位染色，然后在显微镜下用肉眼计数。由于这一过程很烦琐，而且操作误差大，同型标记或评估 DNA（参见方案 23.3-Su）或蛋白质（参见方案 23.4-Su）总量的方法更为可取，虽然这些测量可能与细胞数目并不直接相关（例如，如果细胞的倍性有变

化）。通过结晶紫染色细胞，然后在光密度计上测定吸光值，也可以大体测定每个培养孔中的细胞数目。这一方法也在集落生长实验中用来计算每个集落的细胞数目（McKeehan et al., 1977）。考虑到之前已经证明吸光值和细胞数目之间具有线性关系，可以用考马斯亮蓝、酸性桃红（Boyd, 1989; Skehan et al., 1990）或MTT（Plumb et al., 1989）染色来评估细胞的数目。MTT染色的优点是它只染色活性细胞（参见表23.1和方案24.4）。

23.1.4 流式细胞仪

对细胞悬液进行流式细胞计数，虽然失去了细胞化学和形态的关系，但取样量最多可达 1×10^7 个细胞，而且可以测量多种细胞组成成分和活性（Kurtz and Wells, 1979; Klingel et al., 1994），还可以将这些测量结果和其他细胞参数关联起来，如细胞体积、谱系、DNA含量和活性（Al-Rubeai et al., 1997）。使用更为精细的仪器如FACStar，能更好地进行多参数分析和细胞计数，而小的台式流式细胞仪除了可以测定细胞计数外，还可以对细胞状态给出有用的信息，而且它比一台电子细胞计数器也贵不了多少（图23.6）。活性（通过碘化丙啶摄取）和凋亡（通过Annexin V免疫染色）等参数也可以定量（图23.7）。

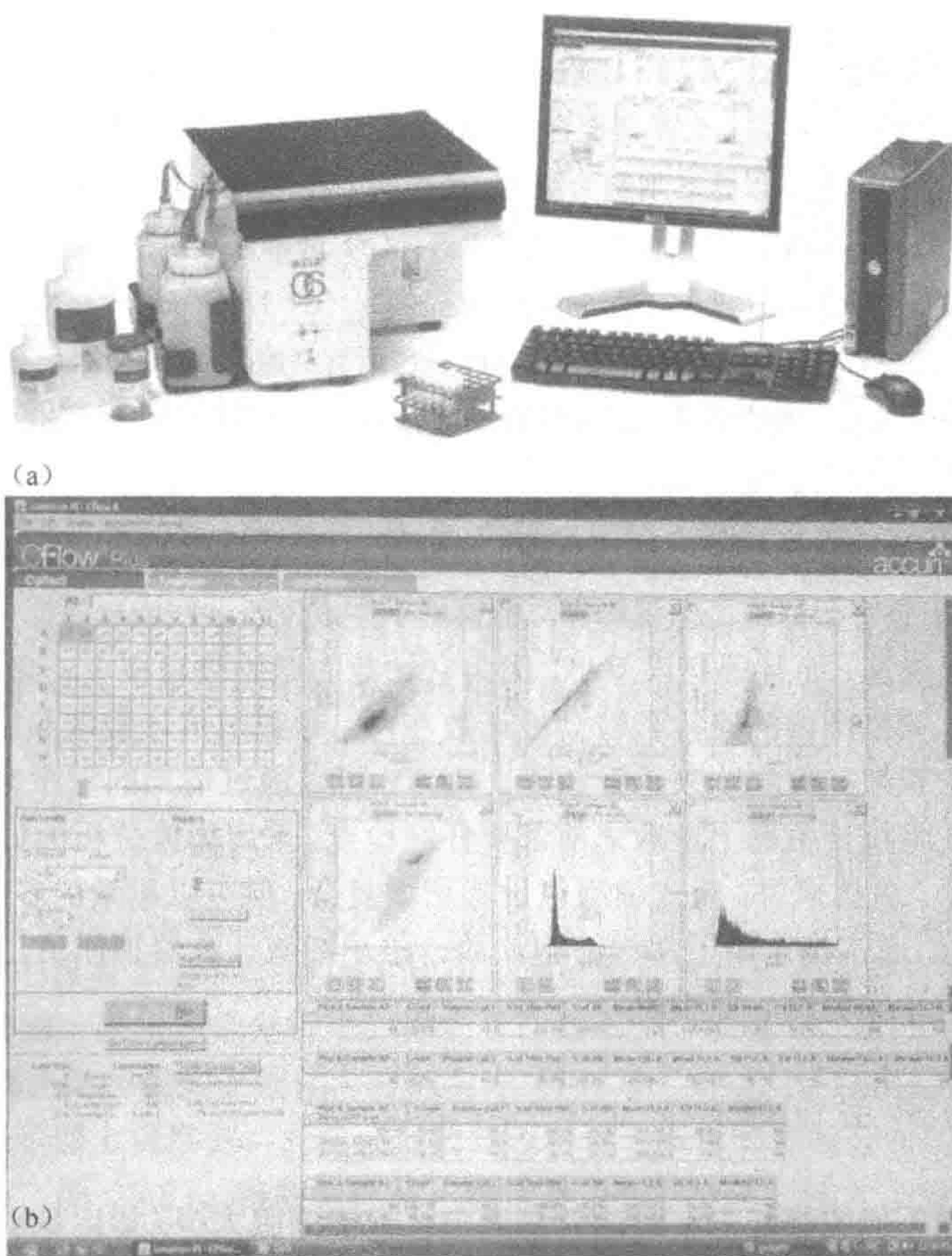


图23.6 Accuri C6 流式细胞仪。（a）细胞计数仪和相关的计算机；（b）典型的屏幕输出（承蒙Accuri流式细胞仪提供）

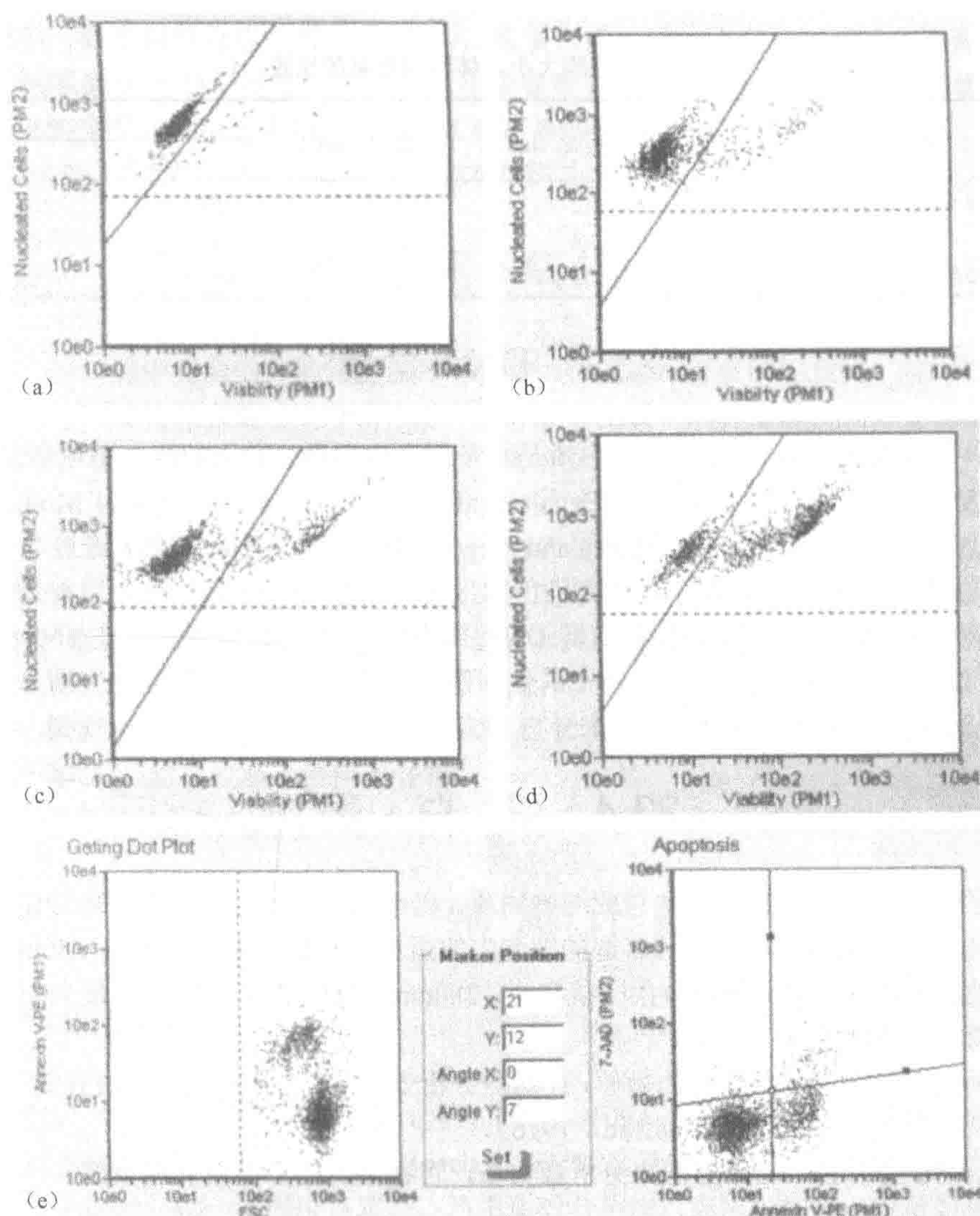


图 23.7 Guava 流式细胞仪的输出信息。来自退化细胞培养的散点图。（a）~（d）4 个图显示死细胞逐渐累积，由 PI 染色，位于右上象限；（e）下面 2 个图显示凋亡的细胞，由抗 Annexin V 的抗体染色（右手边影像上，右下象限）（承蒙 Edward Burnett， ECACC，Public Health England 提供）

23.2 细胞重量和细胞压积

除非是非常大量的细胞，否则很少用到湿重，因为黏附的细胞外液体会引起很大的误差。但是，一个粗略的指导是，每克湿重中有大约 2.5×10^8 个 HeLa 细胞（直径是 14~16μm）、$(8\sim10)\times10^8$ 个小鼠淋巴癌细胞［如 L5178Y 小鼠淋巴瘤、Friend 小鼠红细胞淋巴瘤、骨髓瘤和杂交瘤（直径 11~12μm）］、大约 1.8×10^8 个人双核成纤维细胞（直径 16~18μm）（表 23.3）。同样也很少用到干重，因为培养基中的盐分会影响未固定细胞的质量，而固定的细胞又会失去一些低分子量的细胞内组分和脂类。

细胞压积（PCV）可以通过在特定标刻度的小管（VoluPAC，Sartorius）中离心而测定。

表 23.3 细胞大小、体积和质量的比较

细胞类型	直径（μm）	体积（$μm^3$）	细胞（$g×10^{-6}$）	
			计算的	测定的
小鼠白血病（如 L5178Y 或 Friend）	11~12	800	1250	1000
HeLa	14~16	1200	800	250
人二倍体成纤维细胞	16~18	2500	400	180

23.3 DNA 含量

实际上，除了细胞数量，DNA 和蛋白质是定量细胞物质最为有用的两个测量参数。DNA 可以通过多种荧光方法分析，包括 DAPI（Brunk et al.，1979）、PicoGreen（来自 Molecular Probes 的分析试剂盒）和 Hoechst 33258（Labarca and Paigen，1980）。Hoechst 33258 通过与 DNA 在 pH 7.4 时发生相互作用，在高盐情况下，解离染色体蛋白，其在 458nm 处的荧光发射增强。这一方法的敏感性可达到 10ng/mL，但需要与双链 DNA 作用。DNA 也可以通过它在 260nm 处的吸光值来测定，50μg/mL 的光密度是 1.0。由于其他细胞组分的干扰，直接吸光值方法只用于纯化的 DNA。方案 23.3-Su 是用 Hoechst 33258 来分析 DNA，可在本章的补充材料中找到。

23.4 蛋 白 质

细胞中的蛋白质被广泛用于评估总的细胞物质，也可用于生长实验或作为酶特定活性、受体含量或细胞内代谢量表达的标准。可溶解的细胞中的蛋白质含量可以通过测定 280nm 处的吸光值来直接测得，其受核酸和其他组分的干扰很小。280nm 处的吸光值可以检测最少 100μg 的蛋白质，或大约 $2×10^5$ 个细胞。

比色分析比 UV 吸光值测定更为敏感，在这些分析方法中，用考马斯亮蓝进行的 Bradford 反应是应用最为广泛的方法之一（Bradford，1976）。

方案 23.4-Su 是用 Bradford 方法来分析蛋白质，可在本章的补充材料中找到。

23.5 合 成 速 率

23.5.1 DNA 合成

DNA 合成的测定常常用来代表细胞增殖的程度（同见 23.5.1 节）。[^{3}H] 胸腺嘧啶脱氧核苷（[^{3}H] -TdR）或 [^{3}H] 脱氧胞苷是最常使用的前体。在这些前体中暴露短时间（0.5~1h）可以用来评估速度，当基础速度很低时（如培养密度很高），通过加长暴露时间（24h 或更长），来测定累计的 DNA 合成。[^{3}H] -TdR 用来孵育的时间不应该多于 24h 或者处于很高的特定活性，否则会发生 DNA 辐射分解，因为来自衰退氚的 β 射线路径长度很短（约 1μm）；β 射线在细胞核内释放能量，引起 DNA 链断裂。如果需要延长孵育时间或者较高的特定活性，可以使用 [^{14}C] -TdR 或者 ^{32}P。方案 23.5-Su 用于测定 DNA 合成，可在本章的补充材料中找到。

23.5.2 蛋白质合成

比色分析法测定任何时间的蛋白质总量。一段时间内连续观测，可以用来测定蛋白质净含量

的增加或减少（如蛋白质合成、蛋白质降解），而蛋白质合成的速度可以通过将细胞和放射性同位素标记的氨基酸如［^{3}H］亮氨酸或［^{35}S］甲硫氨酸共同孵育，然后测定（如闪烁计数）一段时间内每 1×10^{6} 个细胞或每毫克蛋白质中掺入到可溶酸物质中的放射性水平。

方案 23.6-Su 用于测定蛋白质合成，可在本章的补充材料中找到。

23.6 准备样品用于酶分析和免疫分析

由于从培养细胞中得到的细胞物质通常非常少，难以进行有效的均质化，因此需要其他的裂解方法来释放可溶性物质和酶用于分析。在样品管或多孔板中培养细胞得到必要的细胞数量（参见 23.8 节，方案 23.8），或者用胰蛋白酶消化大量培养细胞，然后将部分细胞置于分析管中，这都是很方便的。上述任何一种情况下，都应该用 HBSS 或 D-PBSA 清洗细胞，以便去除血清，然后将裂解缓冲液加入到细胞中。应该选择适合分析的裂解缓冲液，但是，如果特定的裂解缓冲液不重要，可以使用 0.15mol/L NaCl 或 D-PBSA。如果待测产物是膜结合性的，在裂解缓冲液中加入 1%去垢剂（脱氧胆酸钠盐、诺乃清洁剂 P40）。如果细胞成团，通过涡旋混匀，将细胞重悬在缓冲液中。将样品管置于含固体 CO_2 的乙醇中（约–90℃）1min，然后置于 37℃水浴中 2min（大于 1mL 的样品放置时间应延长），冷冻和复苏样品 3 次。最后，离心样品，10 000*g*，1min（如用 Eppendorf 离心），然后收集上清用于分析。

或者，可以将整体抽取物用于酶活性分析，如果有必要的话，不溶性物质可以通过离心去除。

23.7 细 胞 计 数

23.7.1 原位标记

荧光标记可以用 CCD 照相机原位测定酶、DNA、RNA、蛋白质或其他细胞组分的含量。荧光标记，可以直接用荧光染料标记（如 Hoechst 33258 或 DAPI 染 DNA），也可以用结合的抗体检测抗原或分子探针。这一过程可以定性，当用影像分析时，也可以定量，但是如果扫描大量细胞时则速度很慢。

23.7.2 流式细胞术

可以用流式细胞术来定量荧光标记的细胞群体，获得非常精确的定量分析，但是细胞结构之间的关系无法得到。流式细胞仪还可以测定额外的参数，包括前向和后向光散射（受细胞大小和表面构型的影响）及产色酶底物或产物。虽然用于细胞分离（参见 17.3.2 节）的流式细胞仪是体积较大而且昂贵的机器，但还可以用一些低价的台式分析仪，如 Guava 和 Accuri（参见 23.1.4 节，图 23.6 和图 23.7）。

23.8 重 复 取 样

由于大部分情况下培养的细胞可以在同一悬液中准备，因此提供大量的重复进行统计分析经常是不必要的。通常，3 个重复就足够了，而对于很多简单的检测（如细胞计数），2 个重复就足

够了。

有很多种类的培养皿可以用于重复性单层细胞培养（参见 7.3 节），而使用哪种培养皿是由下列因素决定的：①每种样品中需要的细胞数目；②取样的频率和类型。例如，如果孵育时间是不变的，重复取样最常在多孔板中进行，如微量滴定板或 24 孔板。但是，如果样品是在一段时间内收集的（例如，每天取样，连续 5 天），那么每天处理时都要挪动培养板，可能会影响其他孔中细胞的生长。这种情况下，重复最好是在单个管中或者 4 孔板中进行。虽然 Leighton 试管（例如，玻璃、Bellco 或者塑料、Nunc）更好，因为它们能够提供一个平整的生长平面，但是也可以使用平面玻璃或者组织培养的塑料试管。或者，如果试管的光学质量不重要，平底玻璃样品试管，甚至玻璃闪烁瓶都是很好的容器。如果使用玻璃瓶或者试管，它们必须和组织培养玻璃器具类一样清洗（参见 10.3.1 节）；如果与闪烁剂一起用过，它们就不能再用于组织培养。

给大量瓶子或试管封口是很令人厌倦的，所以很多人用聚氯乙烯绝缘带封口而不用螺旋盖。这种绝缘带也可以带有颜色来标示不同的处理，黏合膜（如 Sigma）可以用来封住微量滴定板（参见补充材料中的附录III：板密封层），这样可以减少蒸发和污染，使整个板子的表现更为一致。这也意味着可以对单个孔或者排取样，而无需打开板子的其他部位。

处理悬浮细胞通常比处理单层培养细胞要容易，这是因为容器的形状和表面电荷不那么重要。而且使用悬浮培养时可以在一个培养物中多次取样。

23.8.1 数据获得

从培养细胞中获得的数据，与从其他体系中获得的数据相比，在分析方法上未必不同。然而，从细胞培养实验中生成大量的数据，相对来说比较容易，特别是处理微量滴定板时，无需努力就可生成数百个数据点，使用机器时甚至可以生成数千数据。处理组织培养来源的数据取决于这些数据是如何生成的、该实验的规模及参数的数量。虽然绘制一个细胞系在两三种情况下的生长曲线时，细胞计数是获得所需数据的公认方法，但是该方法不能扩展，就是说不能测定多个生长曲线来检测多种细胞系对生长因子组合的反应，除非是使用影像分析软件，如 Incucyte（Essen）或者 Manucyte（Chip-Man）。如果选择了一个比色终点，那么可以使用吸光（如 MTT 分析，见方案 24.4）或者荧光发射［如 Sulforhodamine（Boyd，1989）］，在板子读数器上分析板子，通过合适的软件来减少数据量。

和微量滴定板联合使用的辐射测量的终点（如［^{3}H］胸苷）可以在微量滴定板闪烁计数器（PerkinElmer）上通过同时测定整块板子而获得。同样，大量样品管可以使用机器人系统（Beckman Coulter），自动用 γ 或 β 计算来读数。

23.8.2 数据分析

多个重复分析系统的产生，如微量滴定，使生产大量的数据成为可能。就像 ELISA 分析，限速步骤不再是数据的产生，取而代之的是数据分析。因此，在选择符合培养体系的测量参数时，考虑即将产生的数据量及如何处理这些数据是非常重要的。最简单的方法就是通过网络，或者是分配给这个项目的 PC，把这些数据导入计算机。很多公司现在有上市的计算机程序，可以显示并分析来自微量滴定板实验的数据（不仅仅是 ELISA）。这些程序包括滴定曲线、酶动力学及结合分析。只要具备必要的技能，使用电子数据表来导入这些数据，就能自己建立这一程序；或者可以从板子读数器的供应商那里获得顾问的建议（见补充材料中的附录III）。

23.9 细胞增殖

测定细胞增殖速度常用来评估细胞对某一特定刺激或毒素的反应（参见 24.3.3 节）。常规培养中，定量细胞生长也是非常重要的，因为它是监测培养一致性，判断传代最好时间（参见 12.5.1 节）、最佳稀释，以及不同细胞密度时评估传代效率的关键因素。测定培养基、血清、新的培养瓶或底物等，都需要定量分析。像细胞计数一样，检测细胞增殖有很多不同的方法，可以使用细胞计数、传代效率，或用放射性同位素前体标记 DNA 或细胞周期特异性蛋白抗体（表 23.4）。计数和传代可以认为是直接的方法，而标记技术则是间接方法，通过代谢标记物的表达来显示增殖。

表 23.4 细胞增殖的测定

术语	定义	测定
生长曲线	传代后细胞数目相对时间的半对数图	通过电子计数器或血细胞计数器进行细胞计数（有必要的话用胰蛋白酶消化细胞）
群体倍增时间	给定细胞群体（培养物）倍增的时间。细胞分裂、细胞死亡和非分裂细胞的产物	在生长曲线的指数阶段进行细胞计数
细胞周期时间	从细胞周期中的一个点到细胞再次到达相同的点所需时间	MTT 分析指数生长的细胞 孵育 30min 以后，用 [^{3}H] 胸苷标记有丝分裂的细胞比例，并且在 24~48h 的冷胸腺嘧啶示踪中取样 标记有 BUdR 的细胞进行流式分析，然后在冷胸苷示踪的间隙用抗 BUdR 标记
细胞周期分析	检测细胞周期每个期的持续时间	标记的有丝分裂细胞百分比 标记有 BUdR 的细胞进行流式分析
[^{3}H] 胸腺嘧啶掺入	相对于 DNA 或蛋白质，不溶于 DPM 酸的 [^{3}H] TdR 掺入	闪烁计数可溶性样品
标记指数	带有放射活性前体标记或 Ki67 荧光抗体标记或 BudR 或 PCNA 标记的细胞（%）	用放射自显影检测掺入到 DNA 中的 [^{3}H] 胸苷
生长部分	能够进入细胞周期的细胞	用荧光抗体标记 细胞 [^{3}H] 胸苷或者抗体染色标记的时间长（24~48h），这些细胞中掺入的 BUdR 时间很长
有丝分裂指数	有丝分裂的细胞（%）	计数总群体中有丝分裂细胞的百分比
分裂指数	任意时间点上处于周期中的细胞（%）	用 PCNA 或 Ki67 的抗体染色
存活指数	除去活性染色（如台盼蓝、萘黑或伊红）的细胞（%）	显微镜下观察未经固定的细胞中有活性染料染色的细胞
贴壁效率	在低细胞浓度的情况下，传代以后，能够形成分离集落的细胞数目	胰蛋白酶消化然后接种细胞 10 天到 3 周以后，计数集落，在规定的阈值以上（通常是 50 个细胞）
克隆效率	在低细胞浓度的情况下，传代以后能够形成克隆（来自一个细胞的集落）的细胞数目	胰蛋白酶消化然后接种单个细胞 10 天到 3 周以后，计数集落，在规定的阈值以上（通常是 50 个细胞）
接种效率	在延迟期末已经贴壁的细胞数目，通常需要 19~24h	18~24h 后，析出细胞，胰蛋白酶消化，计数
存活部分	相对于对照中的集落数目，存活的集落所占的部分	和贴壁效率或克隆效率一样，明确的克隆计数是对照的一部分

23.9.1 实验设计

在设计细胞培养实验时，了解培养物的生长状态及动力学参数是非常关键的。培养物在延迟期、指数生长阶段（对数期）和静止期（平台期）之间，很多特性都会有显著变化。因此，在实验开始和取样时，考虑培养物的状态是非常重要的，以便检测培养物是否处于增殖期；如果是，则要检测群体倍增时间（PDT）和细胞周期时间。进入平台期以后，处于生长状态中的细胞部分显著减少，并且细胞形态不同，可能更为分化，还可能出现极性。它们倾向于分泌更多的细胞外基质，而且可能更加难以分离。通常，培养物在对数期更为连贯和一致，所以在对数期末取样产量最高，可重复性最好。

实验从一个状态向另外一个状态转换时，考虑实验的持续时间也是很重要的。在指数期的中期加入一种药物，不久以后就进行分析，可能会有不同的结果，这取决于分析时培养物是否仍处于指数生长，或者它是否已经进入平台期。如果在分析过程中，培养物到达平台期，那么采用微量滴定板分析细胞毒性（参见 24.3.5 节）特别容易出错，因为那些细胞密度最大的孔中，细胞已经到达平台期，细胞增殖减慢，随着更多细胞进入平台期，50%抑制点（ID_{50}）会发生明显偏移（参见方案 24.4）。因此，安排处理和取样时需要对生长周期的参数有详细的了解。

23.9.2 生长周期

传代以后，细胞经过一个典型的生长模式，延迟期、指数期或对数期，然后是静止期或平台期（图 23.8，同见 12.5.3 节）。对数期和平台期能够提供关于细胞系、指数生长的 PDT 和到达平台期时最大细胞密度（如饱和密度）的关键信息。PDT 的测定常用来定量细胞对不同抑制性或刺激性培养条件的反应，如营养物浓度的变化、激素的作用或毒性药物等。它也是系列传代过程中监测培养的一个良好指标，可以计算细胞产量和传代时需要的稀释倍数。

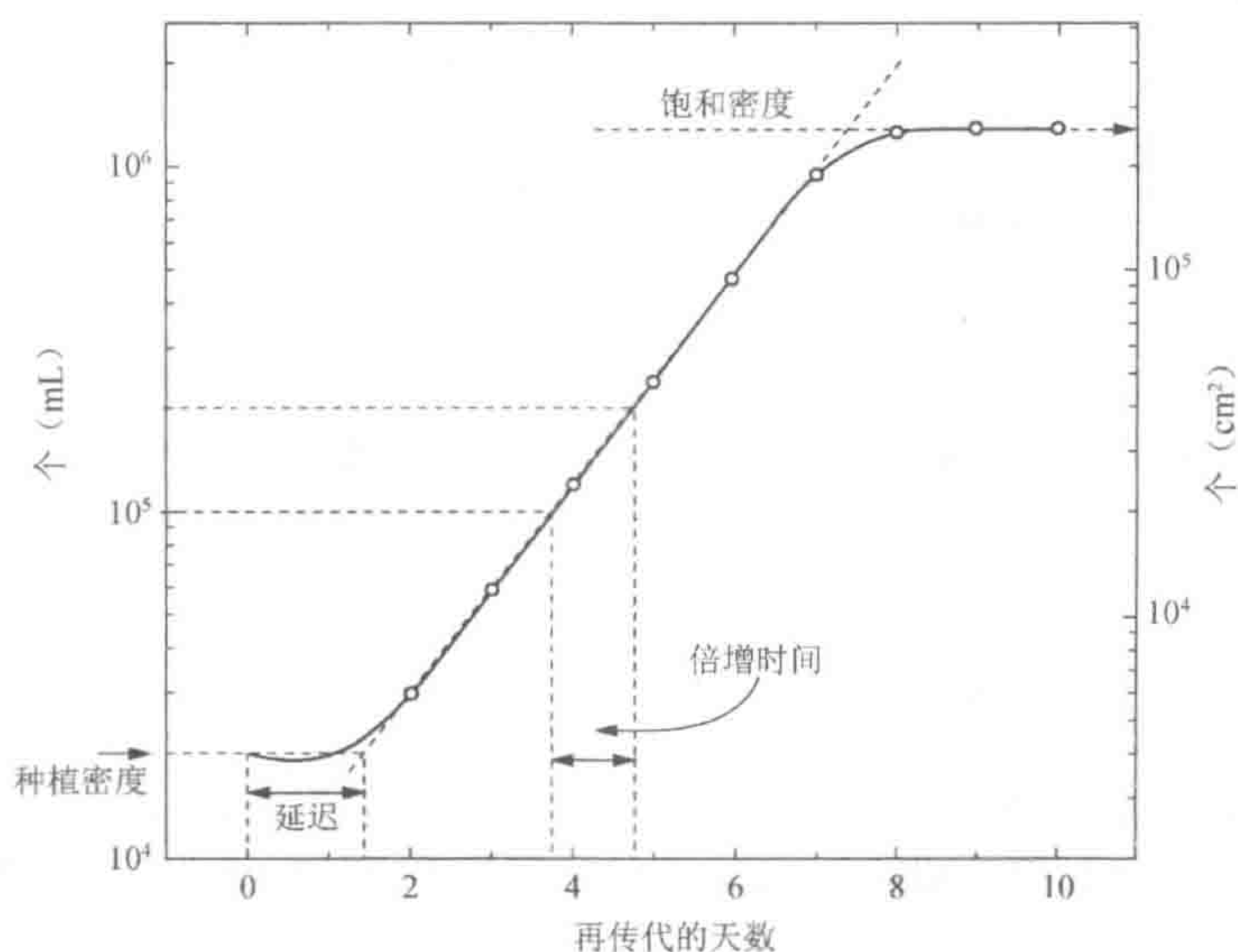


图 23.8 生长曲线。传代以后细胞浓度增长（左边轴）和细胞密度（右边轴）的半对数图。25cm² 培养瓶复瓶中的培养物每天取样和计数。通过图中代表指数期的部分可以画出一条直线，然后从最佳直线的中央部分获得群体倍增时间（PDT）。直线上从指数期外出的种植密度与时间交接的部分就是延迟时间，饱和密度是在曲线最高末端的平台部分（至少是 3 个线性点无细胞浓度的增加）

如果不知道生长曲线的形状，那么单个时间点难以监测细胞生长。如5天以后细胞计数下降，可以是由部分或者全部细胞的生长速度减慢引起的；延迟期延长，提示细胞适用或者细胞丢失（这两者难以区分）；或者是饱和密度减少（图 23.10）。这不是说生长曲线没有价值，它们在检测培养基、血清、生长因子和一些药物时很有用，而且，一旦所监测反应的特征得到完全描述，那么这一类型的反应就可以预测（如 PDT 的改变），然后在对数中期的一个时间点上可以进行单点观测。生长曲线对检测饱和密度特别有用，虽然在饱和密度时，应该用［^{3}H］胸苷标记指数来评估生长（参见 23.11 节，方案 23.11-Su、方案 23.12-Su）。同样需要注意的是，转化细胞不一定总是形成一个稳定的平台，特别是没有进行常规培养基更换的情况下更是如此，此时很多细胞可能会进入凋亡，导致细胞数目急剧下降。

从生长曲线中得到的 PDT 不应该和细胞周期或传代时间混淆。PDT 是一个平均数字，适用于整个细胞群体，并且它描述的是培养过程中各种各样分裂速率的净值，包括速率 0。细胞周期时间或传代时间的测量是从细胞周期的一个时间点开始到细胞再次到达相同的时间点为止（参见 23.13 节），并且只针对细胞群体中正在分裂的细胞，而 PDT 也受到不生长的细胞和死细胞的影响。PDT 在细胞之间有差别，在迅速生长的小鼠白血病细胞如 L1210 中 PDT 为 12~15h；在很多贴壁的连续细胞系中，PDT 为 24~72h；而在生长速度慢的有限细胞系中，PDT 高达 60~72h。

每次培养物传代以后，一个新的生长周期就开始了，可以根据方案 23.7 更为详细地分析它。使用培养瓶获得生长曲线更为费力，即便将重复的次数定为每天 2 次，10 天就需要 20 瓶，还需要有 4 瓶用于染色或者作为后备。对于快速生长的细胞系，应当选择的细胞浓度是 2×10^4 个/mL，而对于生长缓慢的有限细胞系，浓度则为 1×10^5 个/mL。用高一点或低一点的接种浓度来重复生长曲线可以设立正确的接种浓度和传代间隔（参见 12.5.3 节）。

该方案 23.7 在训练时可以加以修改（参见 27.3 节练习 15A）。

方案 23.7 培养瓶中单层细胞的生长曲线

概要

准备好培养瓶，每天计数细胞，直到培养细胞到达平台期。

材料

无菌或无菌制备

- 单层培养细胞，对数期末　　1 个 $25cm^2$ 培养瓶
- 胰蛋白酶，0.25%，天然，加入 10mmol/L 的 EDTA　　50mL
- 生长培养基　　200mL
- D-PBSA（预洗和用于细胞计数）　　500mL
- 培养瓶 $25cm^2$，或者合适大小　　24 个

操作步骤

1. 胰蛋白酶消化细胞用于常规传代（参见方案 12.3）。
2. 用 150mL 培养基，稀释细胞悬液到 2×10^4 个/mL。
3. 接种 24 个 $25cm^2$ 培养瓶。

4. 培养瓶封口并置于孵箱中，37℃。

注意事项 为了方便，该方案使用一种低重碳酸盐（4mmol/L）的培养基，但是，如果使用高重碳酸盐（如23mmol/L），用5% CO_2给培养瓶通气或者在孵箱中使用松的或透气的瓶盖。

5. 24h后，将最初两个培养瓶从孵箱中取出，然后计数细胞。
6. 完全去除培养基。
7. 每个培养瓶中加入2mL 胰蛋白酶/EDTA。
8. 将培养瓶孵育15min。
9. 将细胞打散到胰蛋白酶/EDTA中，然后转移0.4mL上清到19.6mL D-PBSA（用于Beckman Coulter Z1或者CASY）；对于其他的计数器，根据生产商的指示，使用20μL到1mL未稀释的细胞悬液。
10. 在电子细胞计数器上计数细胞。

注意事项 可以使用血细胞计数器来计数细胞，但在生长曲线开始的时候，由于细胞密度低，难以计数，如果使用血细胞计数器，可以将胰蛋白酶用量减到0.5mL，小心打散细胞，使用移液器，不要使胰蛋白酶产生泡沫。将细胞转移到血细胞计数器中，计数足够的方格，使计数超过200个细胞。


彩版22

11. 按照步骤5和步骤6，在48h时和72h时重复收样。
12. 72h时更换培养基，若pH下降（参见方案12.1，彩版22b），可早些时候更换培养基。
13. 对于快速生长的细胞（如PDT 12~24h的细胞），每天收取样品，但对于生长缓慢的细胞（如PDT＞24h的细胞），可以减少收集样品的频率，每两天收一次样，直到细胞到达平台期。
14. 根据pH的下降，每1、2或3天更换培养基。
15. 在2天、5天、7天、10天时，将一个培养瓶中的细胞染色（参见18.4.2节）。

这类分析在比较不同培养基、补充物和生长刺激物或抑制物时很有用，但是，定量分析一个或多个变量时，应该选择多孔板，每个时间点对整个培养板收样。方案23.8可以与练习15B一起用于12孔板（参见27.3节）。

方案23.8 多孔板中单层细胞生长曲线

概要

采用3个不同的细胞浓度接种一系列多孔板，然后每天计数一块板中收集的细胞，直到培养细胞到达平台期。

材料

无菌或无菌制备

• 单层培养细胞，对数期末	1个75cm^{2}培养瓶
• 胰蛋白酶，0.25%，天然，加入10mmol/L的EDTA	50mL
• 含有26mmol/L $NaHCO_3$的生长培养基	300mL
• D-PBSA（预洗和用于细胞计数）	500mL
• 12孔板	10个

非无菌

- 塑料盒子或托盘，用于放置板子。
- CO_2孵箱或用5% CO_2通气的净化盒子。

操作步骤

1. 胰蛋白酶消化细胞用于常规传代（参见方案12.3）。

2. 每个浓度的细胞，用25mL培养基稀释细胞悬液到1×10^5个/mL、3×10^4个/mL、1×10^4个/mL。

3. 接种8个12孔板，最上边的4个孔中，每孔加入2mL 1×10^4个/mL的细胞悬液；第二排中，每孔加入2mL 3×10^4个/mL的细胞悬液；第三排中，每孔加入2mL 1×10^5个/mL的细胞悬液（图20.9），将细胞悬液从孔的中央缓慢加入，这样悬液不会在孔中旋转。同样，不要摇晃板子来混匀细胞，因为培养基的环形运动会使细胞集中到孔的中央。

4. 将板子置于湿润的CO_2孵箱中，或者用5% CO_2通气的密闭盒子。

5. 24h后，将第一个板子从孵箱中取出，然后计数每个浓度的3个孔中的细胞。

 (a) 将要计数的3个孔中的培养基完全去除。

 (b) 3个孔中，每孔加入0.5mL胰蛋白酶/EDTA。

 (c) 将培养瓶孵育15min。

 (d) 加入0.5mL含有血清的培养基，将细胞打散到胰蛋白酶/EDTA中，然后转移0.4mL上清到19.6mL D-PBSA（用于Beckman Coulter Z1或者CASY）；对于其他的计数器，根据生产商的指示，使用20μL到1mL未稀释的细胞悬液。

 (e) 在电子细胞计数器上计数细胞。

注意事项 可以使用血细胞计数器来计数细胞，但在生长曲线开始的时候，由于细胞密度低，难以计数，如果使用血细胞计数器，可以将胰蛋白酶用量减到0.1mL，小心打散细胞，使用移液器，不要使胰蛋白酶产生泡沫，将细胞转移到血细胞计数器中，计数足够的方格，使计数超过200个细胞。

6. 将每个细胞浓度中剩余的孔进行细胞染色（见18.4.2节）。

7. 按照步骤5和步骤6，在48h和72h重复收样。

8. 72h更换培养基，若pH下降，可早些时候更换培养基（参见方案12.1，彩版22b）。



彩版22

9. 对于快速生长的细胞（如PDT 12~24h的细胞），每天收取样品，但对于生长缓慢的细胞（如PDT>24h的细胞），可以减少收集样品的频率，每两天收一次样，直到细胞到达平台期。

10. 根据pH的下降，每1、2或3天更换培养基。

23.9.3 单层细胞生长曲线的分析

（1）按照下列方法计算每个孔、每毫升培养基（图23.9）和每平方厘米可用生长面积上的细胞数目。

 (a) 初次计数：用电子计数或血细胞计数器获得的计数是每毫升胰蛋白酶消化液中的细胞数目。

 (b) 每个培养瓶或孔中的细胞：使用1mL胰蛋白酶进行消化时，初次计数和每个培养

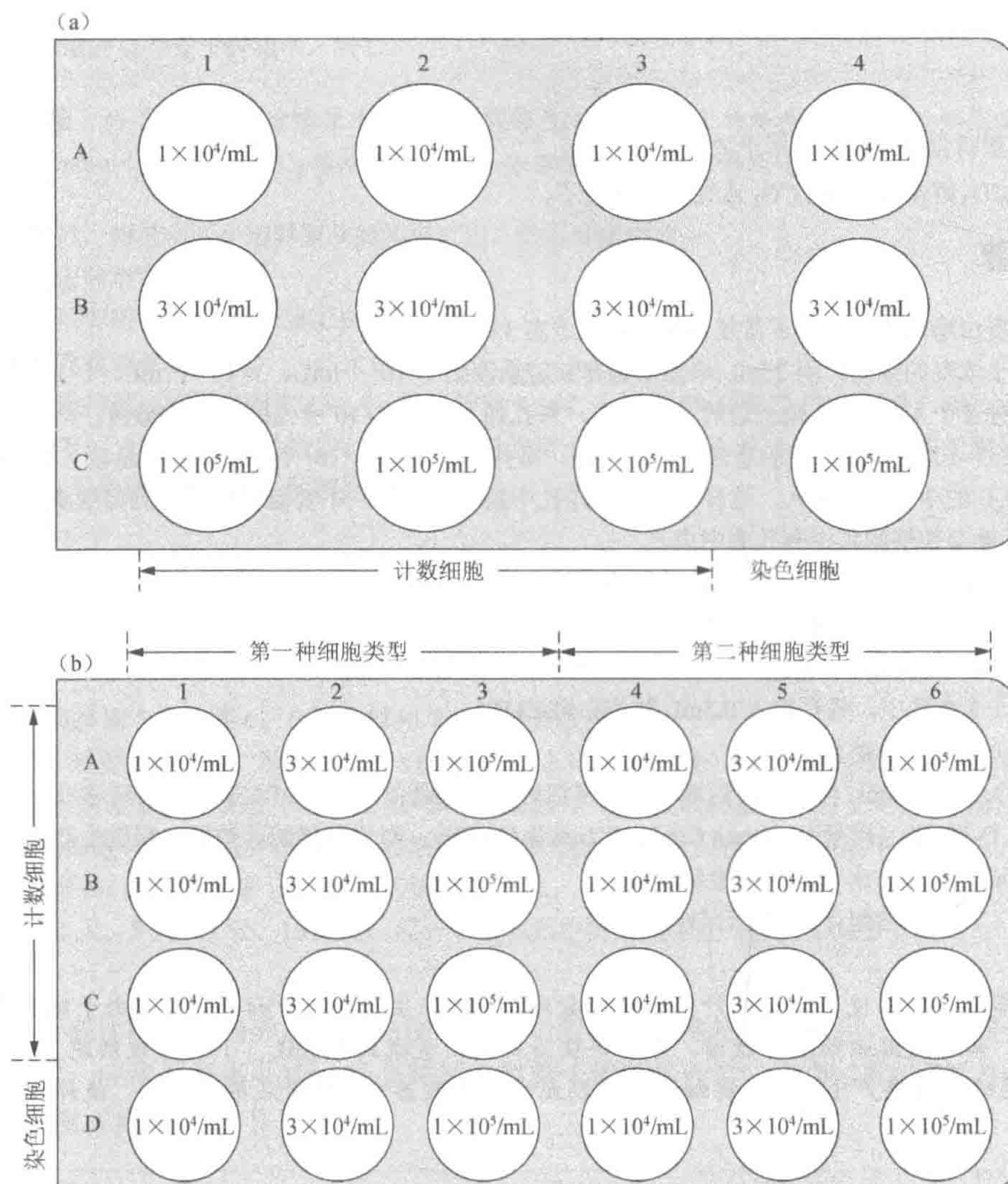


图 23.9 多孔板的布局。建议的布局：(a) 12 孔板，有 3 个不同的细胞浓度，以及用来计数和染色的孔；(b) 24 孔板，加了一个变量，本例中是细胞类型，但也可以是一批血清或不同的培养基或添加物

瓶或孔中的细胞数目是相同的；如果使用 2mL 胰蛋白酶，则将初次计数乘以 2 得出每个培养瓶或孔中的细胞；如果使用 0.5mL 胰蛋白酶，则将初次计数除以 2 得出每个培养瓶或孔中的细胞。

(c) 细胞浓度（每毫升培养基的细胞）：每个培养瓶或孔中的细胞数目除以培养过程中使用的培养基体积。

(d) 细胞密度（每平方厘米生长面积上的细胞数目）：每个培养瓶或孔中的细胞数目除以培养瓶或孔中的表面积。由于生产商之间有细微差别，最好计算自己使用的培养皿的表面积。但是，作为粗略指导，24 孔板每孔是 $2cm^2$，12 孔板每孔是 $3.8cm^2$。方案 23.7 中推荐的培养瓶生长面积是 $25cm^2$。

(2) 将细胞密度（个/cm^2）和细胞浓度（个/mL）都标记在对数刻度上，而时间标记在线性刻度上（图 23.8）。在两条纵轴上的刻度是相同的，但根据每毫升培养基占有的平方厘米分数并不配对。在一个 $25cm^2$ 的培养瓶中，5mL 培养基覆盖 $25cm^2$、0.2mL/ cm^2 或者 5 cm^2/mL 培养基，

所以右手边的坐标轴与左边的坐标轴会有 5 个因素的不配对，左边坐标轴上 1×10^5 和右边坐标轴上 2×10^4 是对等的。

（3）测定延迟时间、PDT 和平台密度（参见图 23.8，同见 23.9.6 节）。

（4）按照方案 23.7，建立合适的起始浓度用于常规传代。如果有必要的话，用不同的细胞浓度重复生长曲线。比较不同情况下的生长曲线（图 23.10），然后尽力解释这些数据（参见图 23.10 的附图说明）。

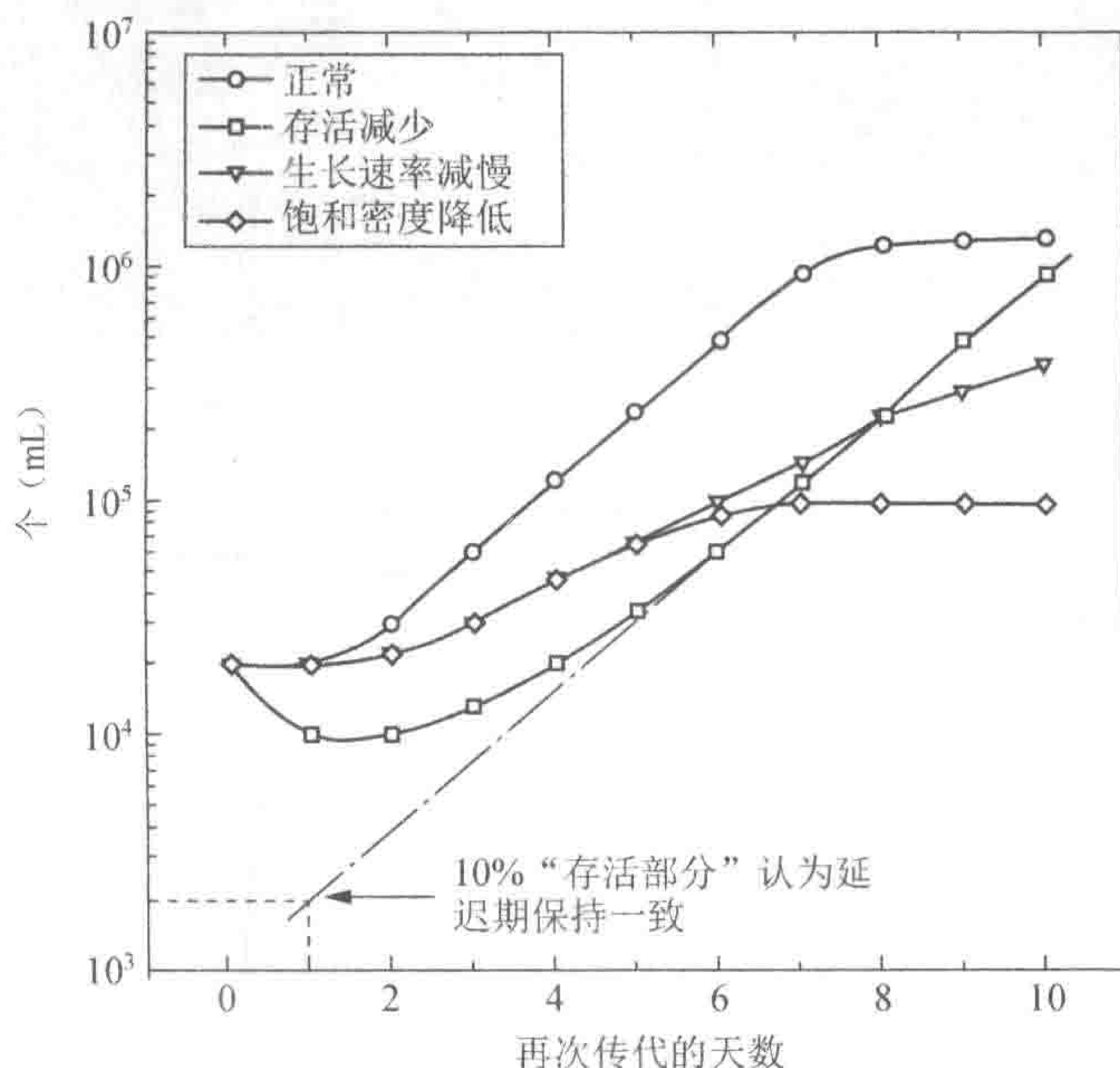


图 23.10　生长曲线的解释。生长曲线形状的变化可以用很多不同的方式来解释，但是这一图例中的标示显示的是从这些曲线中通常可以推断出来的指标

（5）检测每个浓度下染色的细胞，以便：①检测培养瓶或孔中细胞的分布是否均匀、细胞是否生长在孔的周边；②观察随着密度的增加细胞形态之间的差异。

在设立重复培养、收集细胞、计数和分析数据的过程中，绘制生长曲线是一个劳动密集型的工作。现在，可以用影像分析软件，利用倒置显微照相仪，在温度调控的密闭空间中（图 23.11），计算每个视野或者剩余的未被细胞占据的生长面积上细胞的数目，然后自动生成生长曲线（如 CellaVista、Incucyte、Manucyte；参见表 23.2）。从培养瓶或多孔板中获得的重复影像，可以直接观测，也可以远距离在线观测，从而评估培养物的进展。也可以间隔时间观察，并生成构建生长曲线所必需的数据（图 23.12）。

23.9.4　培养基体积、细胞浓度和细胞密度

使用多孔板，而且将其数据与培养瓶中获得的数据比较时，很重要的一点就是要记住表面积一定的情况下，多孔板中使用的培养基体积通常比培养瓶有比例性的增高，而且同样的细胞浓度下，其细胞密度要高。如果将5mL 2×10^4个/mL 的细胞种植到培养瓶中，那么种植时的细胞密度就是4000个/cm^2（20 000×5÷25），如果同样的细胞浓度，2mL 的细胞种植到12孔板中，细胞密度就是10 500个/cm^2（20 000×2÷3.8）。该密度是培养瓶中的两倍多，所以细胞到达平台期的时间至少会早一天。如果要进行准确的比较，那么培养基和培养表面积的比值必须相同，在给定的细胞

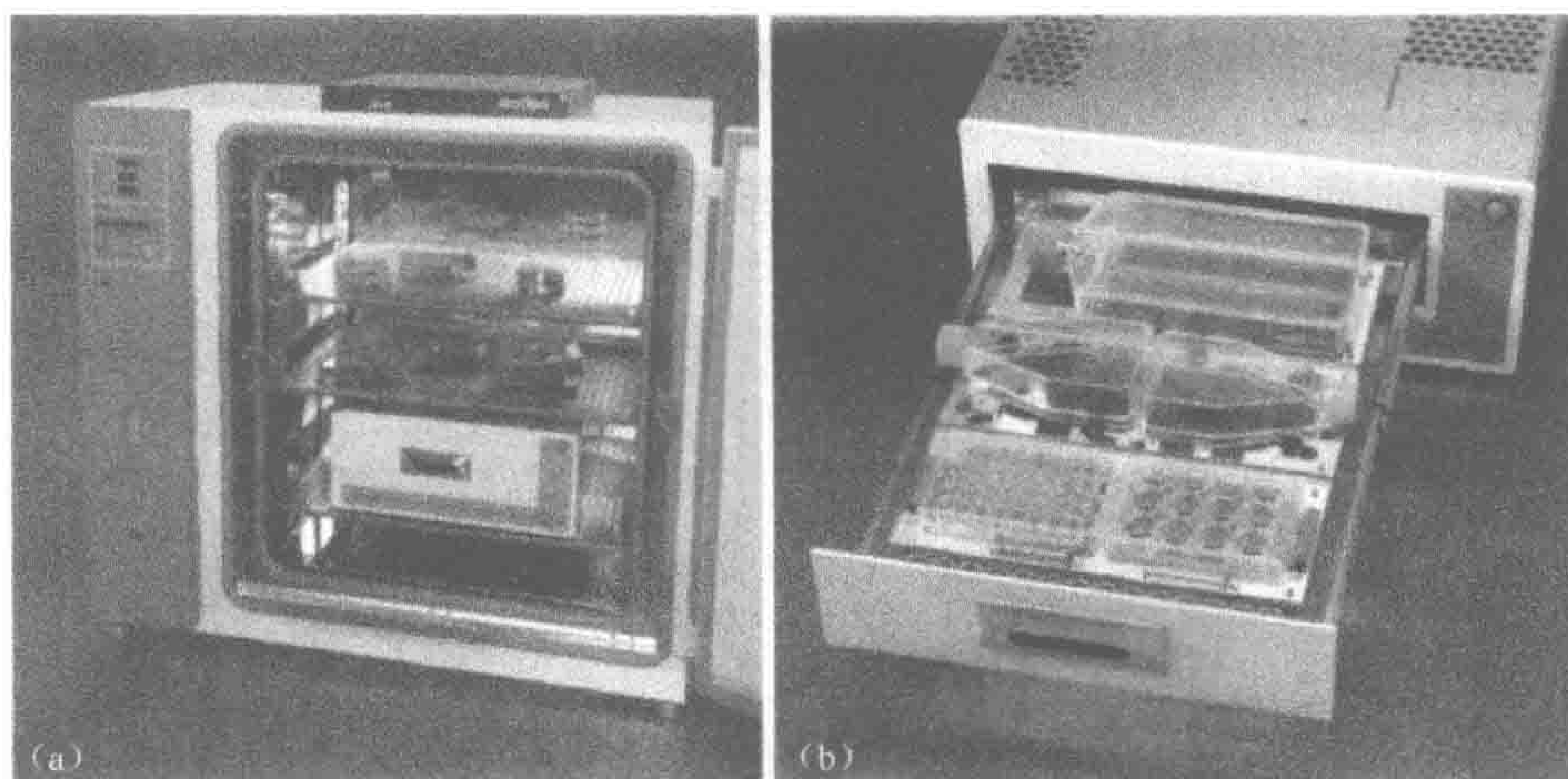


图 23.11　Incucyte。生长过程中对细胞培养物进行影像分析。(a) 孵箱中放置 Incycyte；(b) 打开 Incycyte 的隔断，显示出培养瓶（承蒙 Essen Instruments 提供）

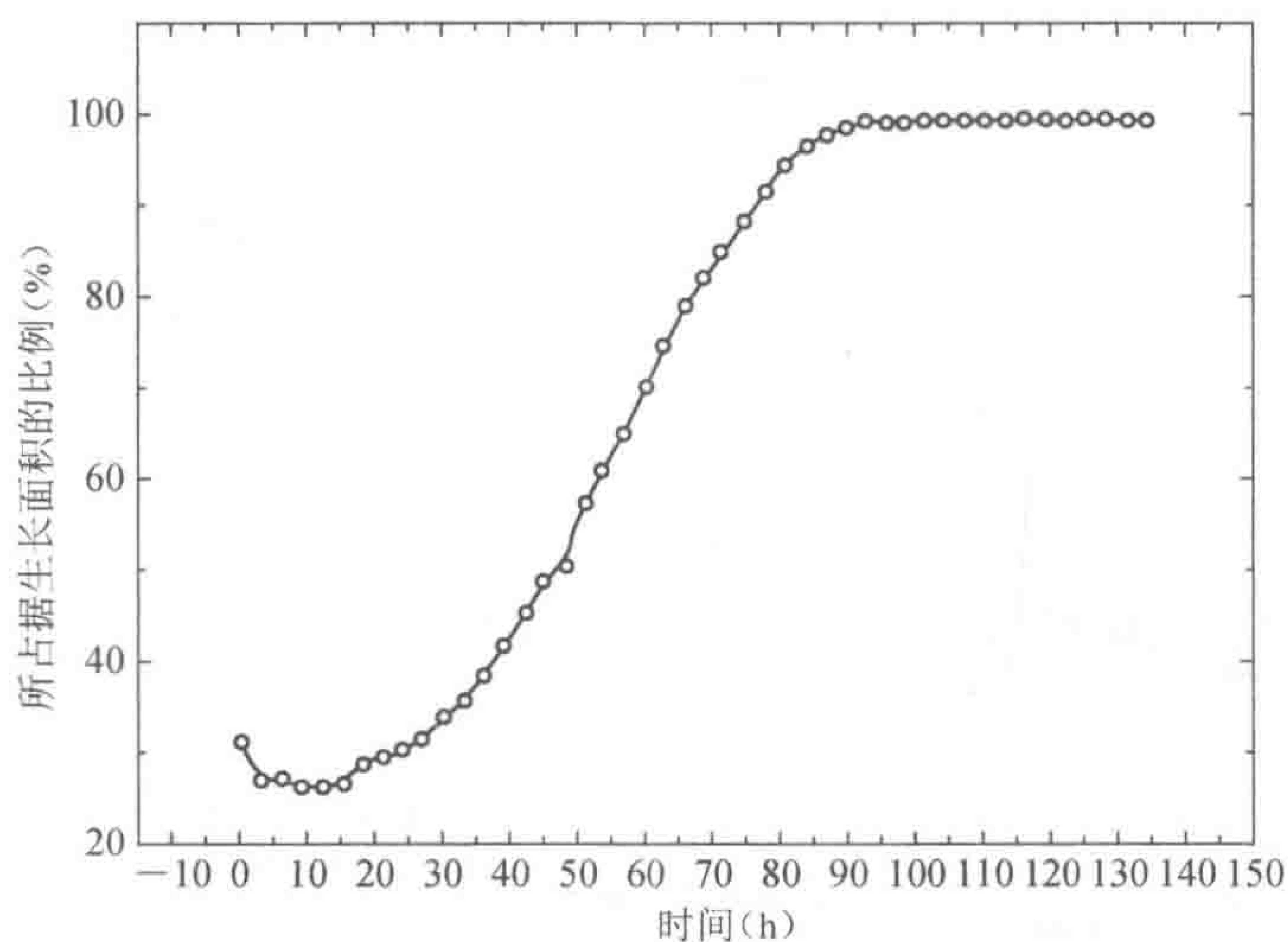


图 23.12　Incucyte 生长曲线。相对于时间（h），所占据生长面积的比例（HCA-7 Col29 人结肠癌细胞系）（承蒙 ECACC J.Cooper 提供）

浓度下，若要获得与 $25cm^2$ 培养瓶中相同的细胞密度，则 12 孔板中加入 0.75mL 培养基。不幸的是，如此低的体积，弯液面的形状会导致细胞分布不均，细胞容易聚集到孔的边缘。这一问题随着孔的变小而越发严峻，因为弯液面的相对效应随着孔直径的减少而增加，一个合理的折中办法就是保证细胞密度（个/cm^2）是一样的，虽然细胞浓度会减少。

多孔板适用于比较不同的生长条件、培养基、血清或者生长因子、细胞毒素，但是如果用生长曲线来建立常规培养的条件，那么绘制生长曲线时用的培养皿必须和常规传代时用的相同（由于每平方厘米上培养基的体积是相同的，$25cm^2$ 和 $75cm^2$ 培养瓶之间的差异很小）。

在微量滴定板上也可以绘制生长曲线，例如，在细胞毒性实验中，用对照板来监测细胞数目（参见 24.3.5 节），然而，由于每个孔中的生长面积很小，因此细胞数目很低，特别是在实验开始阶段，需要将 4 个或 8 个孔的细胞集合起来，而且要用到某些电子计数器来计数；或者，可以用染料或降低的 MTT 吸光值来评估（参见表 23.1 和方案 24.4 中的步骤 14~18）。

23.9.5 悬浮培养

悬浮生长的细胞也可以绘制生长曲线，通常不需要再补充培养基（方案 23.9）。与单层培养的细胞相比，目标是一样的，例如，都是建立常规培养的条件或评估培养条件的差异，由于不需要胰蛋白酶，因此很多样品可以从同一个培养皿中收集。

方案 23.9 悬浮细胞的生长曲线

概要

采用 3 个不同的细胞浓度接种一系列培养物，然后每天计数细胞，直到培养细胞到达平台期。

材料

无菌或无菌制备

- 细胞悬液
- 生长培养基，100mL
- D-PBSA（如果需要可用于细胞计数）
- 24 孔板

非无菌

- 塑料盒子或托盘，用于放置板子。
- CO_2 孵箱或用 5% CO_2 通气净化盒子。

操作步骤

1. 和单层培养细胞一样，将一系列浓度的细胞悬液和培养基加入到孔中（参见方案 23.8）。
2. 从间隔的 3 个孔中取样 0.4mL（或根据使用的细胞计数器选定合适的体积）培养物，保证孔是充分混合并且细胞是完全分离的。
3. 在电子细胞计数器（参见 23.1.2 节）或血细胞计数器（参见 23.1.1 节）上计数样品。
4. 计算每个样品的细胞浓度，和单层培养细胞一样（参见 23.9.3 节），将其标记在对数刻度上，而时间标记在线性刻度上。细胞密度不适用于悬浮培养的细胞，因为这些细胞并没有贴附在生长平面上。

变化 对于每个细胞浓度，都用 20mL 细胞悬液和生长培养基接种 2 个 75cm^2 的培养瓶，每天或者按要求的时间收集一瓶培养瓶中的样品，收样之前，充分混匀细胞，尽量减少培养瓶在孵箱外停留的时间。在监测生长曲线的过程中，不要给培养物加入营养；或者设立一个搅拌培养瓶（参见 7.3.5 节），每天收样。如果在搅拌培养瓶的一侧臂上使用封口膜，那么取样时无需将培养瓶从温暖的孵箱中移出来，只需擦拭封口膜，颠倒培养瓶，然后用注射器和针头通过侧臂取样。

23.9.6 生长周期的各个阶段

生长周期（图 23.8）可以分成 3 个阶段。

延迟期 这一时期是传代和再次种植之后的一段时间，此时细胞数目增加得很少。这是一个适用阶段，细胞替换胰蛋白酶消化过程中丢失的细胞表面组分和细胞外基质，然后贴到底物上，向外延伸。在延伸过程中，细胞骨架重新出现，这是延伸过程中一个必需的部分。酶，如 DNA 聚合酶的活性增加，然后新的 DNA 和结构蛋白合成增加，一些特异的细胞产物可能会消失，直到细胞增殖停止、细胞密度很高时才会再次出现。

对数期 这一时期是在延迟期之后，细胞数目出现指数增长的时期，并且这一时期在细胞达到汇合以后的一或两个群体倍增而结束。对数期的长度取决于接种密度、细胞生长速度和抑制细胞增殖的密度。在对数期，生长分数很高（通常 90%~100%），而且培养物也处于生长最旺盛的状态，这是取样的最佳时间，因为这一群体的一致性最大且存活率最高。然而，这些细胞在周期中的分布是随机的，对于某些实验，可能需要将细胞同步化（参见 23.13 节）。

平台期 在对数期末，培养物变得汇合，即所有可用的生长面积都被占满了，并且所有细胞都与周边的细胞互相接触。达到汇合以后，培养物的生长速度减慢了，在某些情况下，经过 1 或 2 个群体倍增（参见 22.4.2 节），细胞的增殖几乎完全停止。在这一阶段，培养物进入平台或者静止期，生长部分下降到 0~10%。细胞的运动减慢，一些成纤维细胞之间变得具有方向性，形成典型的细胞平行排列。胞质膜“起皱纹”减少了，而且细胞占据底物的表面积减少了，它自己呈现到培养基中的表面积也减少了。相对于结构蛋白，特化蛋白的合成可能会相对升高，而且细胞表面的构成和电荷也可能会改变。

在汇合时，细胞互相接触，出现运动停止，膜起皱及生长停止，这一现象最初是由 Abercrombie 和 Heaysman（1954）描述的，并命名为接触抑制。从那时起，人们意识到正常细胞达到汇合以后生长减慢不单单是由接触引起的，可能也涉及细胞分布减慢（Stoker et al.，1968；Folkman and Moscona，1978），抑制因子的增加，以及培养基中（Holley et al.，1978）的营养成分，特别是生长因子耗尽（Dulbecco and Elkington，1973；Stoker，1973；Westermark and Wasteson，1975）。在静止的单层细胞中，这种耗尽可以是局部的，在细胞周围产生扩散边界（Stoker，1973），通过冲洗可以克服这些边界。（细胞增殖的）“密度限制”这一术语曾用来消除细胞-细胞接触是最主要的限制因素这一含义（Stroker and Rubin，1967），术语接触抑制只用来描述细胞接触直接导致的事件（例如，细胞运动减慢，膜起皱，形成一个严格的单细胞层，细胞之间出现方向性）。

简单的正常上皮和内皮细胞培养物达到汇合以后就停止生长，而且仍旧保持单层细胞，然而，如果常规更换培养基，大部分培养物汇合以后会继续增殖（虽然速度降低），导致出现多层细胞。人胚肺和成体皮肤成纤维细胞会出现运动的接触抑制，但在合适的条件下会继续增殖，在细胞层之间产生胶原层，直到生成 6 层或更多层细胞（Kruse et al.，1970）。但是，这些成纤维细胞仍保持有序的平行排列。因此，术语“平台”或“静止”严格来讲并不准确，使用时要谨慎。

与正常细胞相比，在平台期，自发性转化的培养物或者由病毒或化学致癌物转化的培养物通常会达到较高的细胞密度（Westermark，1974）（图 23.13）。与这种较高的细胞密度相伴随的是生长部分增高，细胞增殖的密度限制丢失。这些培养物的平台期是细胞增殖和细胞丢失之间的一个平衡，这些培养物通常是生长贴壁非依赖性的，意思是它们可以很容易地在悬浮状态生长（参见 22.4.1 节）。

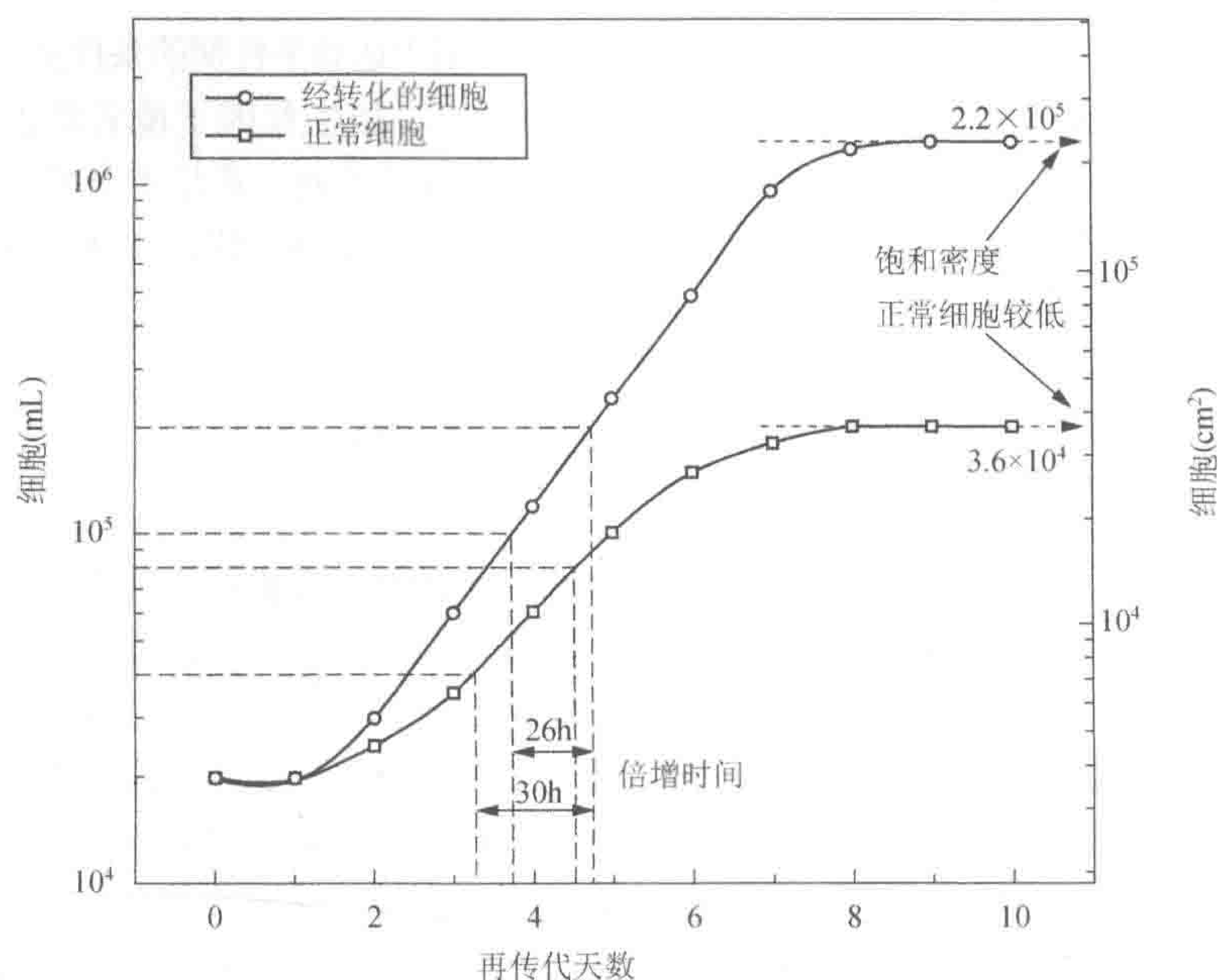


图 23.13 饱和密度。与对应的正常细胞相比，经过转化的细胞，饱和密度增加。这种增加通常伴有 PDT 缩短（数据来自正常人胶质和胶质瘤细胞系，Freshney 等，未发表的观察数据）

23.9.7 生长曲线的衍生物

传代以后的间隙中，通过细胞计数构建的生长曲线可以测定很多参数，这些参数反映了细胞系在一系列给定生长条件下的特征。这些参数中第一个就是延迟期的持续时间或者延迟时间，可以通过指数期的点，向下划线直到与种植密度交接（参见图 23.8），然后就可以读出从种植以后经过的时间，相当于截距。第二个参数是群体倍增时间（PDT），意思是在指数或对数期中间，培养物增加两倍所需要的时间。这一参数不应当与代数时间或细胞周期时间（参见 23.13 节）相混淆，代数时间或细胞周期时间是通过测定细胞群体从细胞周期的一个点到它们再次回到相同的点的转变而获得的。

从生长周期中常规得到的测定参数中，最后一个就是平台水平和饱和密度。平台水平是平台期的细胞浓度（个/mL 培养基），取决于细胞类型和培养基更换的频率。饱和密度是平台期的细胞密度（个/cm^2 生长面积）。饱和密度和平台水平难以精确测定，因为在平台期达到稳态不是很容易。理想状态下，培养物中应该布满培养基，这样可以避免出现营养成分受限或生长因子耗尽等问题。但是，合理的折中办法是使细胞生长在有限的面积上，比如说 15mm 直径的盖玻片或滤过孔、9mm 直径的皮氏培养皿上，加入培养基 20mL，每天更换培养基（参见方案 22.3）。在这些情况下，由培养基导致的生长受限被降低到最小化，细胞密度发挥主要作用。与传统培养情况相比，这些情况下，在平台期计数细胞是更为准确并且可重复的测定方法，注意，术语“平台”并不是说细胞增殖完全停止，相反，它代表一种稳定状态，此时细胞分裂与细胞丢失平衡。

虽然在悬浮培养时讨论“饱和密度”不大合适，但是非贴壁细胞由于培养基耗尽也可以进入平台期。然而，通常处于平台期的悬浮细胞会很快发生凋亡，细胞浓度显著下降，并且可能不会形成稳定的平台。对于正常细胞，稳态可以通过不给培养基补充生长因子而达到。在这种情况下，细胞种植以

后开始生长，然后通过不更换培养基而达到平台期。显然，用于达到平台期的条件必须仔细定义。

生长周期的参数可以用来说明对一种实验变量的反应，如生长因子或者细胞毒素（另见第24章），但其最为重要的应用之一是对细胞系常规扩增的质量控制。在培养条件和规则保持一致的情况下，PDT、延迟期长度及传代时的细胞产量等参数应该保持一致。变化是早期信号，此时要警惕培养条件可能已改变了。

23.10 贴壁效率

在低细胞密度时的集落形成，或称贴壁效率，是分析细胞增殖和存活最为可取的方法（另见方案24.3）。这一技术揭示了细胞群体中生长速度不同，并且区分开生长速度（集落大小）和细胞存活（集落数目）的变化。但是，应当记住，细胞在低密度时，生长情况可能和分离的集落不同。在这种情况下，存活的细胞更少，即便是在理想的条件下，并且直到开始形成集落，所有细胞接触都丢失了。集落生长速度的异质性反映出细胞群体中不同谱系之间细胞增殖能力的差异，但是在高密度时，单层细胞相互作用，此时有细胞之间的交流，这些差异未必会表现出来。

当细胞在密度很低（2~50个/cm^2）时，以单细胞悬液进行接种，细胞会生长为分离的集落（参见方案16.1，彩版6）。这些集落的数目可以用来表示贴壁效率：

形成的集落数目/接种的细胞数目×100=贴壁效率

如果可以确定每个集落是从单个细胞生长得到的，那么这一术语就变成克隆效率。贴壁效率的测定是通过统计低密度接种时生长出来的超过一定体积（通常是大约50个细胞）的集落的数量，而且这一术语不应当用来表示在较高细胞密度接种时贴壁细胞的复苏。对于较高密度时的存活情况，更为合适的表示是接种效率：


彩版6

贴壁的细胞数目/接种的细胞数×100＝接种效率

它应当在贴壁细胞达到最大数目而有丝分裂尚未开始的时候进行测定。这一时间点很难定，因为细胞贴壁最大化和有丝分裂起始之间的窗口很窄，而且这两个事件可能有重叠。但是，接种时间仍然可以为细胞在常规冻存或原代培养过程的复苏中提供一个粗略的测定。

方案23.10用于测定贴壁效率，可以在训练过程中加以改动（参见27.4节练习20），例如，改变血清的浓度（参见彩版6e）或加和不加饲养层（参见方案16.3）。

方案23.10 测定贴壁效率

概要

低密度时种植细胞，然后培养到集落形成（参见方案16.1）；染色并计数集落。

材料

无菌

• 贴壁细胞的培养	1个25cm^2培养瓶
• 生长培养基	400mL
• 胰蛋白酶，0.25%，天然	10mL

- 皮氏培养皿，6cm　　20个
- 试管或普通容器，用于稀释　　20个

非无菌

- 血细胞计数器或电子细胞计数器
- 固定液：无水甲醇　　100mL
- D-PBSA　　200mL
- 染色：结晶紫　　100mL
- 过滤漏斗和滤纸（用于回收染料）

操作步骤

1. 胰蛋白酶消化细胞（参见方案12.3），得到单个细胞悬液。
2. 在用胰蛋白酶消化细胞的过程中：
   (a) 给操作台一侧的培养皿编号。
   (b) 量出培养基用于稀释步骤（图23.14），培养基的量应当足够用于每个稀释量中的3个重复。

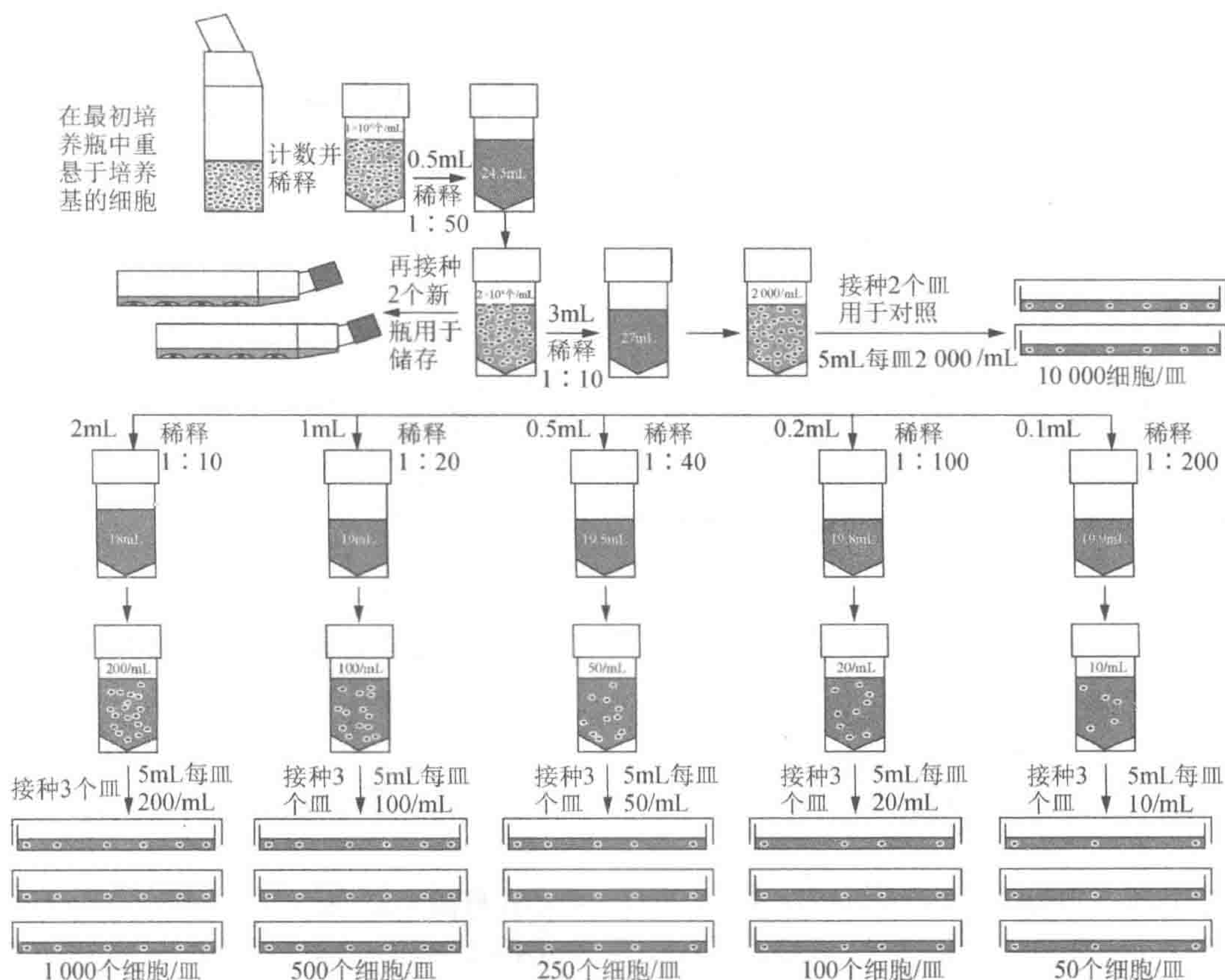


图23.14 稀释细胞用于克隆。推荐的方法，用于连续稀释细胞，获得一系列种植密度，适用于首次克隆细胞系或建立贴壁效率和种植密度的线性关系（图23.15）。接下来，当选定了合适的浓度，就可以用较少的步骤将细胞稀释到想要的浓度（另见图10.17）

3. 当细胞变圆并开始脱离时：

(a) 在含有血清或胰蛋白酶抑制剂的培养基中将单层细胞打散。

(b) 计数细胞。

(c) 稀释细胞到：

(i) 2×10^4 个/mL，2 个 25cm^2 培养瓶用于常规培养。

(ii) 2×10^3 个/mL，作为最高浓度用于后续的稀释。

(iii) 把（ii）进一步稀释，得到 200 个/mL、100 个/mL、50 个/mL、20 个/mL 和 10 个/mL。

4.（iii）中的 5 个稀释浓度，分别取 5mL 含有细胞的培养基种植到皮氏培养皿中。按照 2×10^3 个/mL 浓度种植于 2 个 6cm 皮氏培养皿中，作为对照以防克隆不成功（至少证明最高稀释浓度中有细胞）。

5. 用 5% CO_2 给培养瓶通气，然后放回到孵箱中。

6. 将皮氏培养皿放入透明塑料盒中，然后放置到湿润的 CO_2 孵箱中，最好选择一个很少使用、预留给克隆培养的孵箱。

7. 孵育培养皿直到集落肉眼可见（1~3 周）。

8. 用结晶紫染色集落。

(a) 弃去培养皿中的培养基。

(b) 用 D-PBSA 冲洗细胞，然后弃去冲洗液。

(c) 加入 5mL 新鲜的 D-PBSA，然后加入 5mL 甲醇，轻轻混匀（避免集落脱离）。

(d) 用 5mL 新的甲醇替代 50∶50 D-PBSA∶甲醇混合物，然后固定细胞 10min。

(e) 弃去甲醇，然后在 6cm 培养皿中加入纯的结晶紫 2~3mL，保证整个生长面都被覆盖了。

(f) 染色 10min。

(g) 取出染液，通过滤器，回收到储存瓶中。

(h) 用水冲洗培养皿，然后风干。

9. 计数每个培养皿中的集落，排除那些少于 50 个细胞的集落。放大观察仪可以使集落计数更为简单。

注意事项 定义一个阈值是很有必要的，阈值以上的集落会被计数。如果大部分集落都在 100 到几千之间，那么将阈值设置在每个集落 50 个细胞。在实践中，通过眼睛计数时，这是一个很自然的阈值。但是，如果集落很小（<100 个细胞），那么将阈值设为每个集落 16 个细胞。16 个细胞，相当于 4 次连续分裂，小于 16 个细胞，就很难进行连续细胞增殖。

实验条件中很多变量会影响贴壁效率（参见 16.2.1 节），如 O_2 和 CO_2 浓度，培养基和血清的选择，培养基添加物，以及底物和传代的变化。因此，如果要用贴壁效率来进行分析，优化培养条件然后保持一致就很重要。

23.10.1 集落形成分析

计算每个种植密度的贴壁效率（参见本节导言中的计算部分）。在一系列种植密度中（例如，集落数目和种植的细胞数目应当呈线性关系），贴壁效率应当保持一致。然而，一些细胞在低密度时，可能种板并不好，所以贴壁效率会下降。有时，通过使用饲养层（参见 16.2.3 节）可以将这种情况降低到最低。如果在稍高浓度下，贴壁效率下降，则提示细胞有聚集或者集落有接合。应当挑选位于贴壁效率曲线线性范围内的种植效率，用于以后的分析中（图 23.15）。

也可以通过肉眼计数每个集落中的细胞数目或者用显微测密术来评估集落的方法来测定集落体积的分布情况（例如，分析一种实验培养基或者血清的促生长能力；见 10.6.3 节）。固定并

用结晶紫染色集落以后，就显微测密仪上测定吸光值（McKeehan et al.，1977）或者在自动集落计数器上测定集落的体积（参见23.10.2节）。

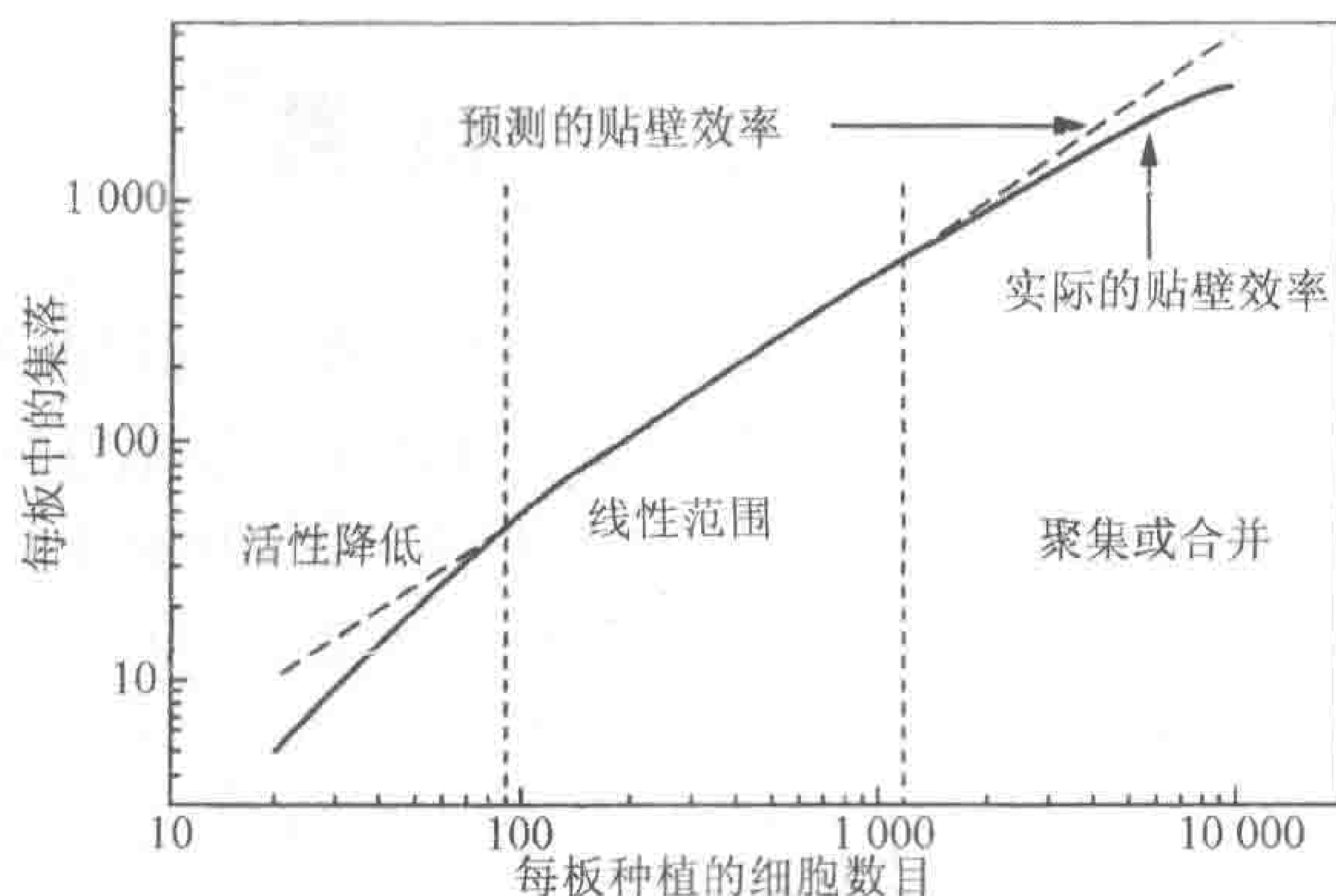


图 23.15 贴壁效率的线性关系。如果在细胞浓度的一个较大范围内，贴壁效率都保持一致，那么曲线就是线性的（虚线），但是，如果低浓度时细胞存活很少，或发生聚集，或在高浓度时有汇合，那么贴壁效率会降低（实线）

23.10.2 自动集落计数

如果集落的形状是一致的而且集落之间是分离的，就可以用自动集落计数仪来计数（参见补充材料中的附录III：集落计数仪）。自动计数仪用CCD摄像机扫描培养板，然后分析影像，即刻得出集落数目的读数（图23.16）。体积识别器根据集落的平均直径来分析集落的体积，但是，这与细胞数目之间并不总成比例，因为细胞可能堆积在集落的中央。

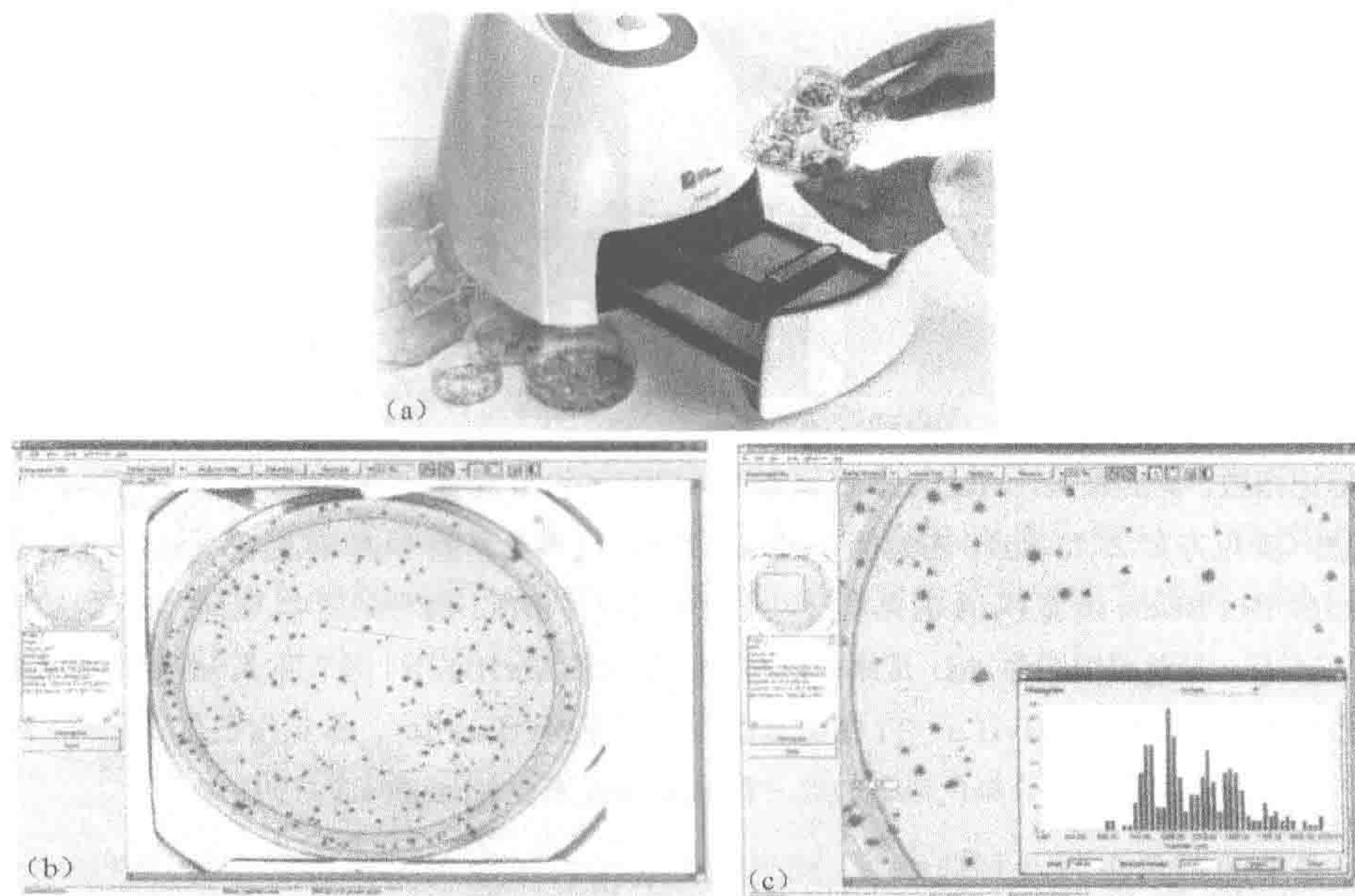


图 23.16 自动集落计数器。贴壁效率和存活分析中计数集落的自动计数器ColCount。(a) 样品盘打开的计数器和一系列样品类型；(b) 标出集落的扫描影像；(c) 插入的柱状图，是所挑选的集落大小分布的柱状图（感谢Oxford Optronix提供图片）。这种集落计数器现在已经被GelCount取代，后者也可以计数琼脂悬浮的集落并处理更多系列的多孔板

虽然这些仪器很贵，但是它们能够节省大量的时间，使集落计数更为客观。不过，对于那些重叠超过20%或者轮廓不规则的集落，这些仪器就没那么好的效果了。

23.11 标记指数

正在合成DNA的细胞会掺入［^{3}H］-TdR（参见23.5.1节）。标记细胞的百分比称为标记指数（LI）（例如，Westermark，1974），可以通过放射自显影来测定（参见方案23.13-Su，图23.18、图23.20、图23.21）。用［^{3}H］-TdR标记0.5~1h后测定标记指数，发现指数生长的细胞（LI＝10%~20%）和平台期（LI约1%）的细胞差别很大。正常Mv1Lu细胞与突变*ras*转染获得的瘤细胞（Khan et al.，1991）相比，其［^{3}H］-TdR掺入测定的LI要低（彩版14d，图23.17）。由于平台期的LI很低，因此可能要将［^{3}H］-TdR标记的时间延长到24h，以便显示出在饱和密度时的差异。

方案23.11-Su和方案21.13-Su采用［^{3}H］-TdR来测定标记指数，可以在本章的补充材料中找到。计数标记细胞的方法可见图23.18。


彩版14

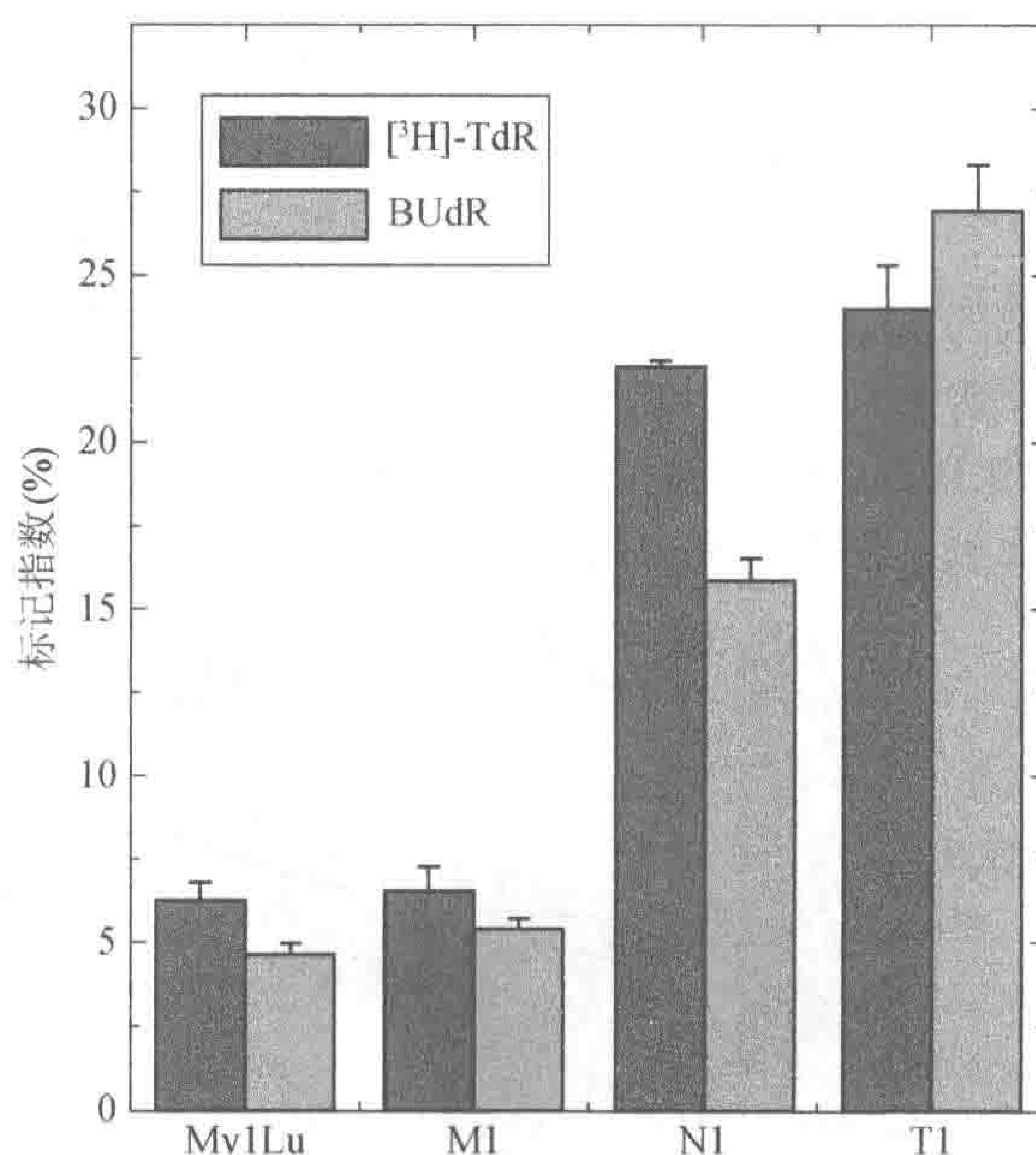


图23.17 标记指数。貂肺细胞，Mv1Lu和原癌基因转染衍生物用［^{3}H］-TdR标记1h，固定，然后用放射自显影乳剂包被（参见方案23.13-Su），吉姆萨（Giemsa）染色（参见彩版14d）或用溴脱氧尿苷（BUdR）标记1h，固定，然后用抗BUdR结合DNA的免疫过氧化物酶的抗体染色。每种细胞中，计数染色的细胞核在总细胞中的比例。Mv1Lu是对照细胞系，M1是原癌基因*myc*转染的Mv1Lu，N1是正常人*ras*基因转染的Mv1Lu，T1是用突变人*ras*基因转染的Mv1Lu。T1细胞是癌性的，与Mv1Lu相比，标记指数显著升高（$P<0.001$），溴脱氧尿苷染色也是如此（Tabular data来自Khan et al.，1991）

23.11.1 生长分数

如果用［^{3}H］-TdR标记细胞，时间长短不同，最多48h，在最初的几个小时内，LI相对于时间迅速增加，然后变平坦直到非常低的水平，几乎是一个平台（图23.19）。相对于垂直轴，这个平台的水平就是培养物的生长分数，即在标记时处于周期中的细胞比例。

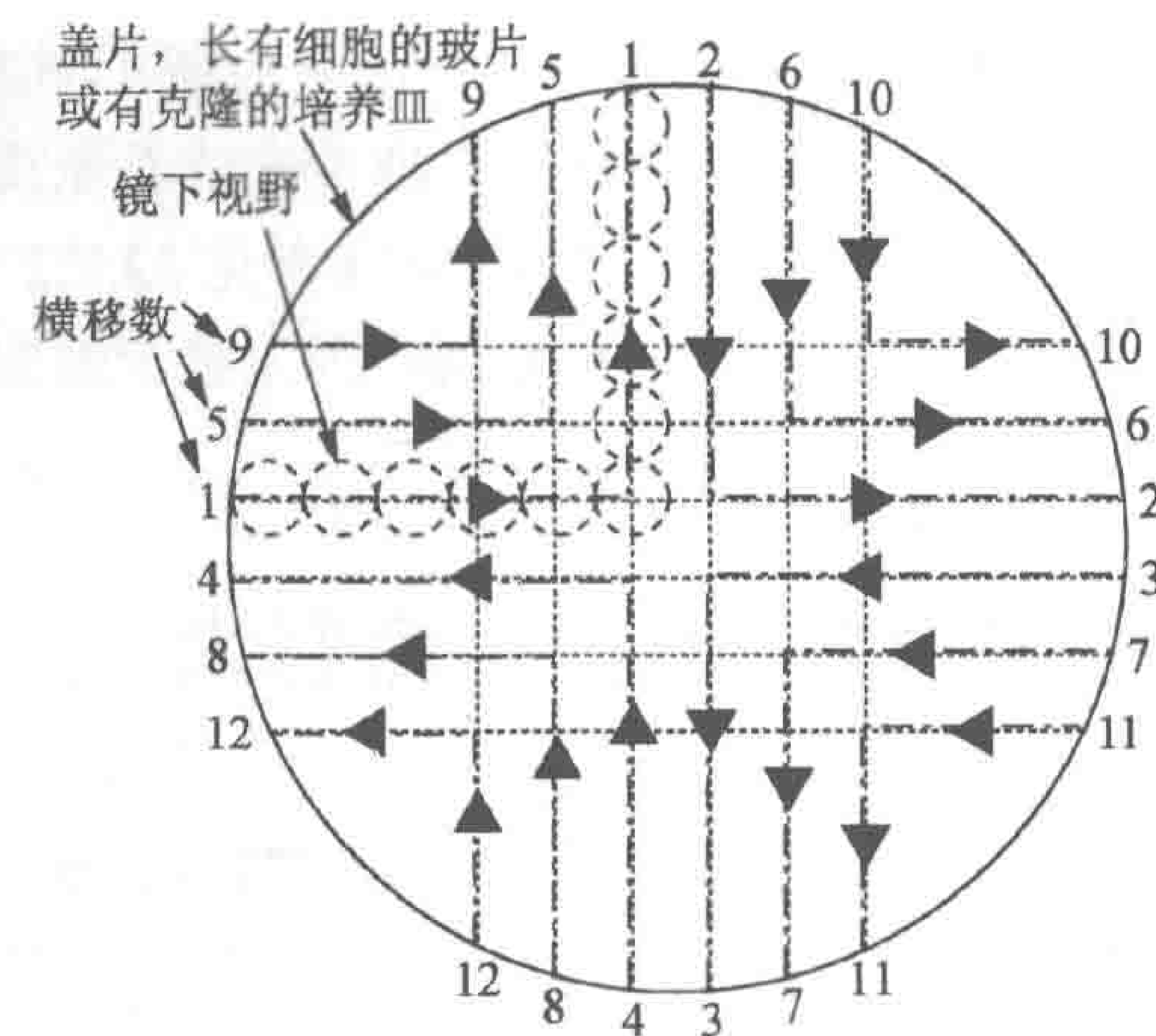


图 23.18 扫描玻片或培养皿。对玻片或培养皿的细胞学制备物进行分析的扫描模式。每一个点线圆圈代表一个显微镜视野，大圆圈代表标本的范围（如张盖片、培养皿、培养小孔，或玻片上的细胞部位）。标线可用浅色透明墨汁的尼龙尖头笔划出

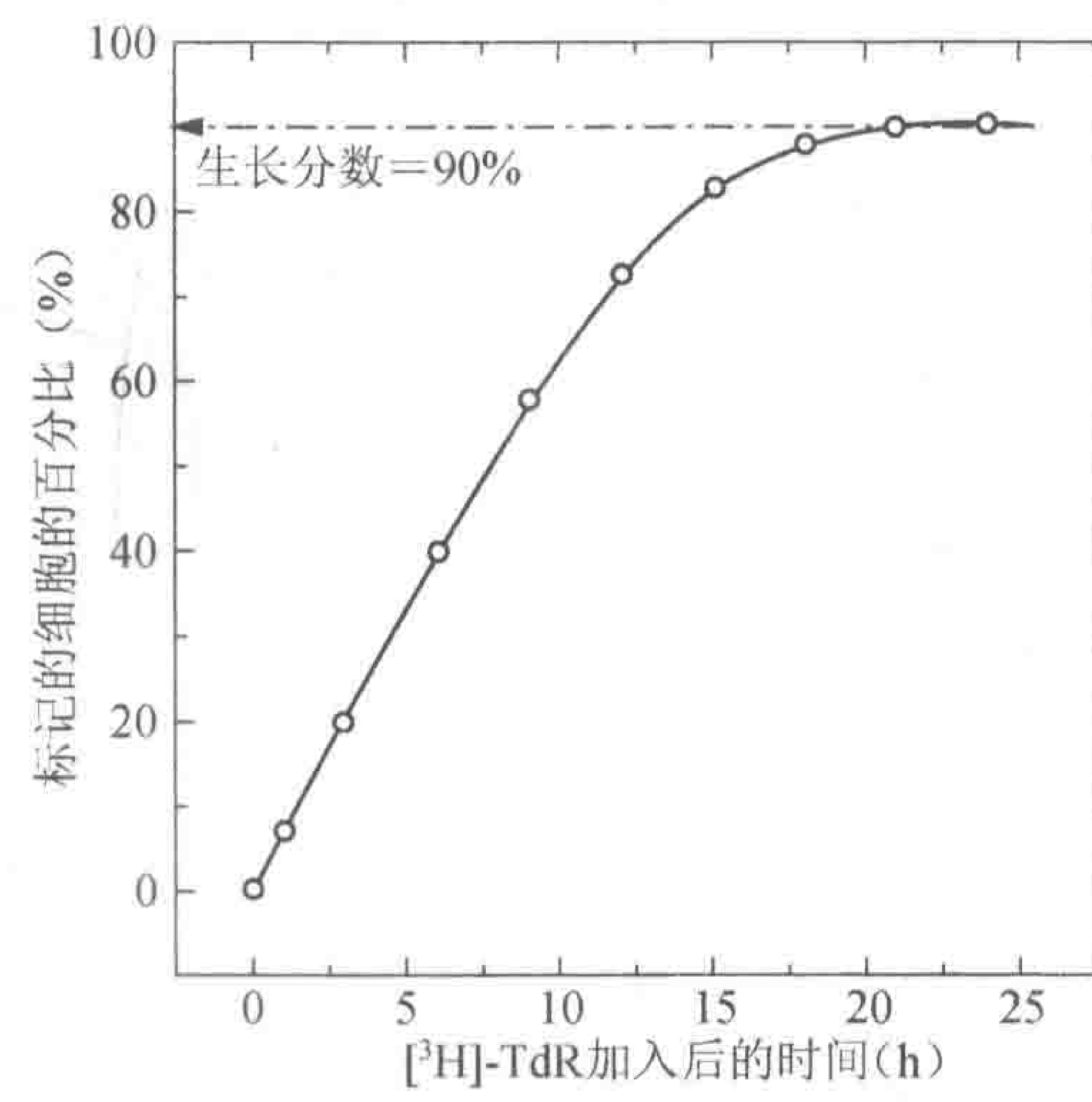


图 23.19 生长分数。细胞用连续的［^{3}H］胸苷标记以确定生长分数，并且被标记的细胞百分比通过放射自显影来确定其间隔（参见 23.11.1 节）

方案 23.12-Su 用于测定生长分数，可在本章的补充材料中获得。

也可以用 BUdR 标记细胞来测定 LI，BUdR 可以掺入到 DNA 中。随后，可以用抗 BUdR 抗体（Dako）进行免疫染色来测定这一效应。从该方法中得到的结果通常和使用［^{3}H］-TdR 得到的结果是一致的（Khan et al.，1991）（同见图 23.17）。

23.11.2 有丝分裂指数

有丝分裂指数是有丝分裂的细胞所占的分数或比例，这是通过计数染色细胞中有丝分裂的细胞在整个细胞群体中的比例得出的。扫描模式应当与计数标记细胞核的相同（图 23.18）。

23.11.3 分裂指数

很多抗体，如 Ki67（Zhu and Joyce，2004）或者抗 PCNA（Katdare et al.，2004）能够在分

裂周期中染色细胞。这些抗体针对的是细胞周期中表达的蛋白质，而不是静止细胞中的蛋白质。一些抗体是针对 DNA 聚合酶或者周期蛋白。细胞由免疫荧光或者免疫过氧化物酶染色（参见方案 18.6），然后用细胞学方法（图 23.18）或者流式细胞术（参见 23.7.2 节）计算染色细胞的比例。该图给出的指数比有丝分裂计数或者 DNA 标记都要高，因为整个细胞周期的细胞都可以染色。它也对生长分数具有特别有用的提示作用。

23.12 放射自显影术

本节内容旨在全面介绍任何小分子前体进入冷的酸不溶性大分子（如 DNA、RNA 或蛋白质）中的显微放射自显影术（图 23.20、图 23.21）。其他方法可根据本节的方法变更，或者在文献中找到（Rogers，1979；Baker，2006）。由于放射自显影术广泛用于电泳印迹或对显微标本的物质定位，因此可将这两种方法区分为宏观放射自显影术和显微放射自显影术（参见附录II）。

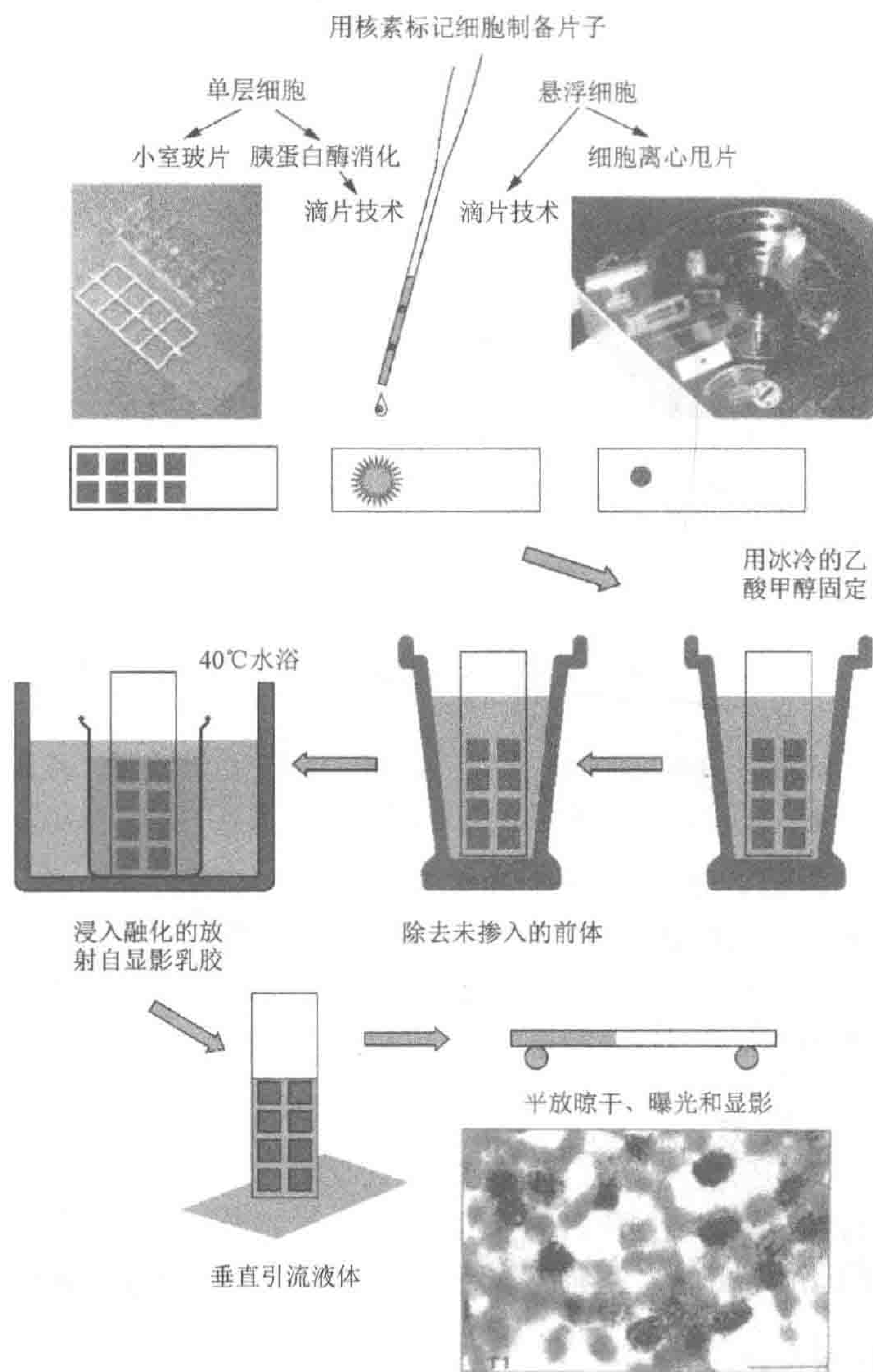
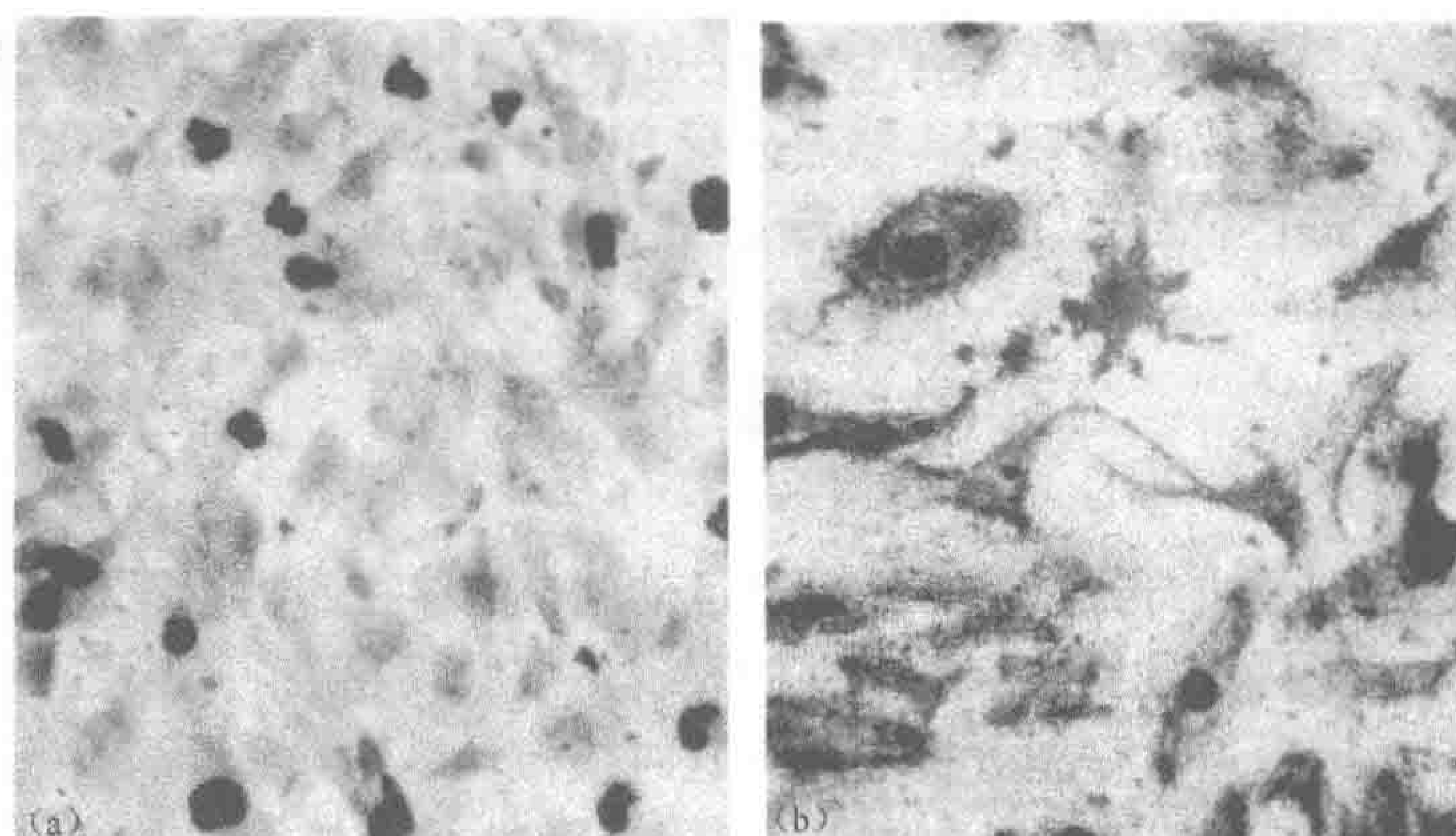


图 23.20 显微放射自显影术。 制备培养细胞的显微放射自显影照片的步骤




彩版 13


彩版 14

图23.21 显微放射自显影照片。这两幅图片是将[^{3}H]胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到单层细胞的例子。用0.1μCi/mL（3.7kBq/mL）、200Ci/mmoL（7.4GBq/μmoL）的[^{3}H]胸腺嘧啶脱氧核苷孵育正常的神经胶质细胞24h，然后清洗，再按方案23.13-Su所述的步骤进行操作。（a）典型的密集标记的细胞核，适合于确定标记指数（参见方案23.11-Su）；（b）支原体感染的神经胶质细胞，胞质也被标记（亦见彩版13c、d，彩版14d）

适合于显微放射自显影的核素列在表23.5中。低能量的放射性核素（如^{3}H或^{55}Fe）与稀薄乳胶联合应用时可得到较高的细胞内结构分辨率。稍高能量的放射性核素（如^{14}C和^{35}S）主要在细胞水平进行定位。更高能量的核素（如^{131}I、^{59}Fe和^{32}P）在微细水平的分辨率较低，但可用于色谱、DNA和RNA的印迹、蛋白质电泳的宏观放射自显影，在这些情况下低能量放射性核素的吸收可能限制掺入物的检测。低浓度的高能量核素（^{14}C和上述的核素）与稠核乳胶联合使用可用于追踪，可用于定位一些高标记颗粒（如感染细胞群体或组织的病毒颗粒）。

表23.5 适用于放射自显影的核素

核素	发射	平均能量（mV）	半衰期
^{3}H	—	0.018	12.3年
^{55}Fe	X射线	0.0065	2.6年
^{125}I	X射线	0.035，0.033	60天
^{14}C	—	0.155	5570年
^{35}S	—	0.167	87天
^{45}Ca	—	0.254	164天

由于氚释放的β粒子在水性介质中平均范围约1μm，并可产生高分辨率，故氚常常用于细胞或亚细胞水平的放射自显影术。氚标记的复合物通常比^{14}C或^{35}S标记的等同物便宜，而且半衰期较长。然而，由于氚标记的复合物发射的能量较低，应尽量使放射敏感的乳胶贴近样本，在细胞和乳胶之间不留空隙是很重要的。即使在这种情况下，也只能检测到样本顶部1μm范围内的掺入物。

方案23.13-Su用于显微放射自显影，可在本章的补充材料中找到。

23.13 细胞周期时间

为了测定细胞周期的长度（代数时间）及各个时期，用BUdR持续标记细胞，然后在间歇期

利用免疫荧光显微镜或者抗 BUdR 所结合 DNA 的抗体，通过流式细胞术测定标记的掺入。对于流式细胞术，细胞也要用碘化丙啶标记，然后分析 BUdR 掺入和 DNA 含量的比值来追踪细胞沿周期的进展（Dolbeare and Selden，1994；Poot et al.，1994）。

23.14 细胞迁移

培养中的细胞，特别是成纤维细胞，是可以运动的，能够在底物上迁移很大的距离，取决于细胞密度和刺激物如生长因子的存在。运动性的表现是细胞膜起皱，可由延时摄像观察到。运动的数量难以定量，但是可以通过详细分析一系列延时摄像（参见方案 18.7）或者对细胞在包被有胶体金（Kawa et al.，1997）的培养皿中由于吞噬作用产生的痕迹进行影像分析，从而对细胞迁移进行定量。

细胞迁移也可以借助分析细胞通过有孔膜（Cell Biolabs）的运动来分析迁移，就像在 Boyden 小室（Schor，1994）中进行的趋化实验，或者滤过孔的迁移实验（参见 22.5.3 节）。

参考文献

Abercrombie M, Heaysman JEM (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture; II: "Monolayering" of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **6**:293–306.

Al-Rubeai M, Welzenbach K, Lloyd DR, Emery AN (1997). A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. *Cytotechnology* **24**:161–168.

Baker JRJ (2006). *Autoradiography: A comprehensive overview.* Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks, Vol. 18. New York: Oxford Univ. Press.

Boyd MR (1989). Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles Pract. Oncol.* **10**:1–12.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.

Brunk CF, Jones KC, James TW (1979). Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.* **92**:497–500.

Dolbeare F, Selden JR (1994). Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: Application to cell-cycle kinetics. *Methods Cell Biol.* **41**:297–316.

Dulbecco R, Elkington J (1973). Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature* **246**:197–199.

Folkman J, Moscona A (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**:345–349.

Holley RW, Armour R, Baldwin JH (1978). Density-dependent regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: Growth inhibitors formed by the cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:1864–1866.

Hsiung F, McCollum T, Hefner E, Rubio T. (2013). *Comparison of count reproducibility, accuracy, and time to results between a hemocytometer and the TC20 automated cell counter.* Bio-Rad Tech Note Bulletin 6003.

Katdare M, Osborne M, Telang NT (2004). Soy isoflavone genistein modulates cell cycle progression and induces apoptosis in HER-2/neu oncogene expressing human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **21**:809–815.

Kawa S, Kimura S, Hakomori S, Igarashi Y (1997). Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett.* **420**:196–200.

Khan MZ, Spandidos DA, Kerr DJ, McNicol AM, Lang JC, de Ridder L, Freshney RI. (1991). Oncogene transfection of mink lung cells: Effect on growth characteristics *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* **11**:1343–1348.

Klingel S, Rothe G, Kellermann W, Valet G (1994). Flow cytometric determination of cysteine and serine proteinase activities in living cells with rhodamine 110 substrates. *Methods Cell Biol.* **41**:449–459.

Kruse PF Jr, Keen LN, Whittle WL (1970). Some distinctive characteristics of high density perfusion cultures of diverse cell types. *In Vitro* **6**:75–78.

Kurtz JW, Wells WW (1979). Automated fluorometric analysis of DNA, protein, and enzyme activities: Application of methods in cell culture. *Anal. Biochem.* **94**:166.

Labarca C, Paigen K (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* **102**:344–352.

McKeehan WL, McKeehan KA, Hammond SL, Ham RG (1977). Improved medium for clonal growth of human diploid cells at low concentrations of serum protein. *In Vitro* **13**:399–416.

Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* **49**:4435–4440.

Poot M, Hoehn H, Kubbies M, Grossmann A, Chen Y, Rabinovitch PS (1994). Cell-cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoechst 33358-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods Cell Biol.* **41**:327–340.

Rogers AW (1979). *Techniques of autoradiography*, 3d ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Sanford KK, Earle WR, Evans VJ, Waltz HK, Shannon IE (1951). The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Natl. Cancer Inst.* **11**:773.

Schor SL (1994). Cytokine control of cell motility modulation and mediation by the extracellular matrix. *Progress Growth Factor Res.* **5**:223–248.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H., Kenney S, Boyd MR (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:1107–1112.

Stoker MGP (1973). Role of diffusion boundary layer in contact

inhibition of growth. *Nature* **246**:200–203.

Stoker MGP, Rubin H (1967). Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* **215**:171–172.

Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman B. (1968). Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells. *Int. J. Cancer* **3**:683–693.

Westermark B (1974). The deficient density-dependent growth control of human malignant glioma cells and virus-transformed glia-like cells in culture. *Int. J. Cancer* **12**:438–451.

Westermark B, Wasteson A (1975). The response of cultured human normal glial cells to growth factors. *Adv. Metab. Disord.* **8**:85–100.

Zhu C, Joyce NC (2004). Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **45**:1743–1751.

（王世华　译）

第24章

细胞毒性

在生命科学研究领域中，细胞培养已经成为一种非常有效地进行体外研究的实验体系，这就使得以细胞为基础的实验变得越发重要。诚然，细胞培养并不能完全反映体内的状况，也不能代表一个完整生命体的状况。但是，细胞培养依然是观测独立事件的非常有效的方式，如特殊基因的转录或者是代谢通路的表达，以及它们是如何被异常或生理状况调节及影响的。目前，帮助筛选靶向药物也成为细胞培养的一种新功能。

在经典的方法中，可以直接刺激细胞的增殖或者抑制生长来进行分析，进而检测毒性效果。然而，随着对细胞反应检测方法的改进，在荧光和化学发光指示剂的辅助下可以对单个细胞进行微阵列分析，这样就可以分析大样本和多个变量。想要分析如此大量的数据，并要在整个系统中分析这些数据，这就需要更加高端的分析软件。这种复杂的分析通常要根据用户的需求来定制，因为它的独特性，所以在这个章节中暂时不做讨论。高通量筛选的原则在之前的章节里已经讨论过（参见 21.5.2 节、21.5.3 节），因此在这一章中主要讨论传统的细胞反应，诸如生长率、生存率、存活率、突变和致癌性，同时简要地讨论一下刺激和炎症这些新兴领域。

24.1 活性、毒性和存活

一旦细胞从正常的体内环境转成体外培养，细胞的活性，尤其是实验操作期间的细胞活性便成为一个基本问题。与组织来源相关的培养物状况，以及如何量化其在生长和表型表达方面的变化已在前几章讨论过。然而，这些数据并不能完全令人信服，除非能证明绝大多数细胞是有活性的。此外，许多体外实验只是为了测定所研究化合物的潜在细胞毒性，因为这些化合物可以用作：①药物或化妆品，必须证明其是没有毒性的；②或者它们被设计作为抗癌成分，细胞毒性是其发挥作用的关键。

新的药物、化妆品、食品添加剂等在投入公众使用前都必须进行大量的细胞毒性实验，通常要涉及大量的动物实验。在欧洲进行这些实验需遵守一项新法规（Cox and Chrisochoidis，2003），该法规于 2009 年在局部地区实施，并于 2013 年全面实施。部分体外细胞毒性实验在人道主义及经济方面均有很大压力，特定细胞系和交互性器官培养物的引入、长期建立的培养物的连续应用有望使这一问题得到合理解决。

在体内，毒性是一个复杂的事件，它可能是细胞的直接损伤，如细胞毒性的抗癌药物；可能是生理效应，如肾脏的跨膜转运或颅内的神经毒性；也可能是炎性反应和其他全身效应，可以发生在毒性作用部位和其他部位。目前还很难在体外监控全身的生理效应，因此多数实验都是在细

胞水平进行测定的。细胞毒性的定义不是一成不变的（Kroemer et al.，2009），它取决于研究的性质，以及细胞是死亡还是表型发生了改变。另外，细胞有不同的死亡方式，如坏死（图 12.1）、凋亡（彩版 17c、d）、自我消化（即自噬）；细胞也可能停止增殖（细胞静态平衡）和（或）终末分化（如角化）（Galluzi et al.，2009）。要证明抗癌药物的作用，需要具有杀细胞的效应（细胞杀伤作用），或对细胞生长的抑制，并非一定有细胞死亡（细胞增殖抑制）。而想要证明药物不具毒性，则需要对其特异靶标进行更精确的分析，如改变基因转录、细胞间的信号或细胞间的相互作用，包括可能引起炎性或过敏反应的作用。


彩版 17

虽然大部分实验都过于简化了要监测的事件，但由于它们经济、易于量化、可重复性好而仍被采用。但这些实验用于当今药物的开发是不够的，这一点也日益明显，因为现代药物的开发更强调分子靶标的特异性及代谢调控的精确性。我们依然需要进行细胞毒性的大体实验，但更需要精细的实验加以补充，如代谢通路调控和信号传递的实验。或许其中最典型的是诱导炎症或过敏反应的实验，其不包含过敏原的细胞毒性，但仍然是体外最难证明的结果之一。

传统的细胞毒性实验着重于细胞生长或生存。细胞生长通常指细胞的再生潜能，测定方法包括克隆性生长（参见方案 23.10）、细胞群体大小的净变化（如生长曲线，见方案 23.7~方案 23.9）、细胞数量（总蛋白或总 DNA）或代谢活性（如 DNA、RNA 或蛋白质的合成；MTT 还原反应）的改变。其他方面将在随后的章节讨论（参见 24.4~24.6 节）。

24.2 体外局限性

任何体外实验都应该能用相同或相似的细胞体内反应加以解释，或者至少对于体内、体外实验之间存在的差异非常清楚，这一点非常重要。

24.2.1 药物代谢动力学

体外毒性实验通常是细胞实验。例如，暴露于药物后的复杂药物代谢动力学若在体外重建是非常困难的，药物的暴露时间和浓度、浓度的变化速率、药物代谢（活化及解毒）、组织渗透、清除和排泄方面在体内与体外实验中通常存在显著的差异。尽管有可能模拟这些参数，如用多细胞肿瘤球状体测定药物渗透或浓度时间效应（$C \times T$），但大多数研究着重于直接的细胞反应，因为其更加简单，并且可以重复。

24.2.2 新陈代谢

很多无毒物质在经过肝代谢后变为有毒物质，此外，很多在体外有毒的物质也可能被肝酶解毒。因此，若用体外实验替代动物实验，必须证明潜在的毒素在体外进入细胞的方式与体内是相同的。这种实验可能需要一些额外的步骤，如肝微粒体酶的纯化制备（McGregor et al.，1988）、与活化肝细胞（Guillouzo and Guguen-Guillouzo，2008）（另见补充材料中的附录III，Hepatocytes）或可衍生为肝细胞瘤的细胞如 Hep-G2 或 HepaRG（参见 25.2.6 节、25.2.7 节）共培养。共培养也许要应用三维滤过培养或二维细胞微阵列（Khetani and Bhatia，2008），或者中空纤维阵列分析（Lűbberstedt et al.，2012）。也可以在可调控启动子的控制下，将代谢酶类的基因导入靶细胞

进行遗传学修饰（Macé et al.，1994）。

24.2.3 组织和全身反应

反应的性质也必须加以仔细的考虑。细胞存活（参见方案 24.3）或代谢（参见 24.3.4 节）的变化可以用来测定体外的毒性反应，然而体内的主要问题可能是组织应答（如炎症反应、纤维化、肾衰竭）或系统应答（如发热、血管扩张）。要使体外实验更加可信，必须构建这些应答模型。可以利用器官培养构建这些模型，它可以由不同的细胞类型重新组建并维持在适当的激素微环境中（参见方案 20.4 和短篇综述 20.1）。

若认为在体外一定无法模拟复杂的组织甚至器官反应，那就错了。只要我们应用了适当的组织模型，并正确理解了细胞间的相互作用，以及内分泌激素与局部旁分泌和自分泌因子间的相互作用，炎症应答、致畸性疾病及神经功能紊乱等实验在体外或许都是可行的。

24.3 分析方法的类型

研究的试剂、应答的性质及特定的靶细胞决定了分析方法的选择。体外分析方法可以分为五大类。

（1）*生存力*。一种快速或短期应答，例如，膜渗透性的增加，难以控制与细胞增殖或存活相关的特定代谢途径的紊乱。

（2）*存活*。自我更新能力的长期维持（5~10 代或更长）。

（3）*代谢*。通常以微滴定为基础的中期分析，可以测定暴露时或其后的代谢应答（例如，脱氢酶活性，DNA、RNA 或蛋白质合成）。为了更好地反映细胞的生长潜力和存活率，也可在暴露后 2 或 3 次群体倍增时进行测定。

（4）*遗传毒性和转化*。状况改变时的存活情况（例如，在生长调节发生改变或恶性转化时，发生一个或多个基因突变）。

（5）*刺激性*。一种与体内炎症、过敏或刺激反应类似的应答，难以在体外被模拟，但或许可以在器官型培养时通过监测细胞因子的释放来进行分析。

24.3.1 生存力

生存力分析主要用于测定经过潜在的损伤过程后存活细胞的比例，如原代分离、细胞分离或冻融，而不是观察长期的细胞毒性反应。



彩版 17

多数生存力实验都以膜的完整性发生破坏为基础，可以通过染料的摄取进行测定，这种染料在正常情况下无法透过细胞膜，如萘黑（苯胺黑）（彩版 17a）（Kaltenbach et al.，1958）、台盼蓝（Schrek，1958；Hathaway et al.，1964）、碘化丙啶（图 23.7）（Darzynkiewicz and Gong，1994），以及其他染料。这种染料在正常情况下被活细胞摄取并储留，此时被释放出来（如二乙酰荧光素或中性红）；或者通过破裂细胞释放出的乳酸脱氢酶进行测定（Kendig and Tarloff，2006）。然而这种效应是瞬时的，并不是每次都能预示最终的存活，因为染料的排斥总是高估细胞的生存力。例如，在液氮中冻融的细胞 90%可能排斥台盼蓝，但仅有 60%的细胞在 24h 后被证实贴壁。

应当注意，细胞传代时测定的细胞生存力可能意义不大，因为很大一部分经胰蛋白酶消化的细胞及胰蛋白酶消化前预清洗时的细胞都被倒掉了。若要准确测定传代培养细胞的生存力状况，应收集培养基、清洗液及胰蛋白酶消化液作用后的所有细胞。然而，若要准确测定再接种细胞的生存力，则不应包括复原的细胞。

染料排斥法 大部分普通的实验都可以用对台盼蓝的排斥来作为细胞生存力的评价。可以应用方案24.1进行训练（参见27.3节练习11，27.4节练习18B、19）。

方案24.1 染料排斥法测定细胞生存力

概要

将细胞悬液与染料混匀，在低倍显微镜下观察。

材料

无菌或无菌制备

- 受试细胞（例如，胰蛋白酶消化的贴壁细胞，冻融的细胞或原代离散的细胞）
- 与细胞类型相适应的生长培养基
- 0.25%粗制胰蛋白酶，或有同样作用的物质（参见表11.1）
- D-PBSA

非无菌

- 血细胞计数板
- 测定生存力的染料（如用D-PBSA或HBSS配制的0.4%台盼蓝或1%萘黑）
- 巴斯德吸管
- 显微镜
- 手执计数器

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化或离心与重悬，制备高浓度的细胞悬液（约1×10^6个/mL）。
2. 取一块干净的血细胞计数板并固定好盖玻片（参见方案23.1和图23.1）。
3. 将一滴细胞悬液和一滴台盼蓝或四滴萘黑染料混匀。
4. 将混悬液加至血细胞计数板的计数室中（参见方案23.1）。
5. 静置1~2min（不要放置过久，否则活细胞会受到损伤并吸收染料）。
6. 将计数板置于显微镜上，选择10×物镜并用网格线聚焦（图23.1，彩版17a）。
7. 计数细胞总数及着色细胞数。
8. 清洗计数板并放回盒内。


彩版17

分析 计算未着色细胞的百分数，即为本方法得出的细胞生存力百分数。如果在步骤3中准确地测量细胞悬液和染料的各自体积，那么这种细胞生存力的测定方法就可以与方案23.1结合

起来（方案24.2）。

染料摄取法 活细胞可以摄取二乙酰荧光素并将之水解为荧光素，荧光素不能透过活细胞的细胞膜（Rotman and Papermaster，1966）。活细胞可以发出绿色荧光而死细胞则不能。没有生存力的细胞也可以被碘化丙啶染色并发出红色荧光（Darzynkiewicz and Gong，1994）。细胞生存力可以用发绿色荧光的细胞百分数来表示。此方法可用于CCD分析或流式细胞仪（参见23.7.2节，图23.7）。

方案24.2 染料摄取法测定细胞生存力

概要

用碘化丙啶和二乙酰荧光素的混合液将细胞悬液染色，用荧光显微镜或流式细胞仪监测。

材料

无菌或无菌制备

- 单细胞悬液
- 双乙酸荧光素，10μg/mL，溶于不含酚红的HBSS
- 碘化丙啶，500μg/mL，溶于不含酚红的HBSS

非无菌

- 荧光显微镜
- 滤光片

荧光素：激发450/590nm，发射LP 515nm

碘化丙啶：激发488nm，发射615nm

操作步骤

1. 细胞悬液的制备与染料排斥法相同（参见方案24.1），但需用不含酚红的培养基。
2. 以1∶10的比例加入荧光素染料混合液，二乙酰荧光素的终浓度为1μg/mL，碘化丙啶的终浓度为50μg/mL。
3. 将细胞置于37℃孵育10min。
4. 将一滴细胞液滴在载玻片上，盖上盖玻片，在荧光显微镜下观察，用激发488nm或536nm、发射562~588nm或617nm观察碘化丙啶，用激发494nm、发射521nm观察荧光素。

分析 发绿色荧光的是活细胞，而发红色荧光的是没有生存力的细胞。发绿色荧光的细胞占细胞总数的百分比可以用来表示细胞生存力。着色的细胞悬液也可以用流式细胞仪分析（参见23.7.2节，图23.7）。

中性红摄取法 活细胞可以摄取中性红（每毫升培养液含40μg）并存储于溶酶体中，而没有生存力的细胞则不能存储中性红。中性红的摄取可以定量，用甲醛固定细胞、用乙酸乙醇溶解

染料、在 570nm 处用 ELISA 板读数（Borenfreund et al.，1990；Babich and Borenfreund，1990）。中性红容易沉淀，因此含染料的培养液通常需要温育过夜并在使用前离心。此方法不能测定细胞总数，但可以显示吸光值的下降，其下降与活细胞的损失相关并容易进行自动化测定。

24.3.2 存活

虽然短期实验方便且操作简单快捷，但只能说明实验时细胞是死细胞（也就是可渗透的）。然而，通常需要数小时甚至几天的时间，那些受有毒物质影响的细胞（如放射、环境毒物、抗癌药物）才能表现出来。所以，需要不同性质的实验测定细胞生存力，因为在测定的时候死细胞可能已经消失了，或顽强的细胞已经恢复了。因此长期实验用于说明细胞的存活力而非短期毒性。存活是指细胞具有再生能力，通常用贴壁效率来测定（参见方案 23.10），通过显示几代细胞的增殖能力来测定细胞的存活力。如果细胞的贴壁效率足够高，其集落可以代表整个细胞群体。尽管不甚理想，但通常贴壁效率超过 10%还是可以满足实验要求的（方案 24.3）。

方案 24.3 贴壁细胞的克隆形成实验

概要

用不同浓度梯度的实验试剂处理细胞 24h。经胰蛋白酶消化后，以低细胞密度接种并温育 1~3 周，染色（彩版 6a、e）后计数集落（图 24.1）。



彩版6

材料

无菌

- 生长培养基
- D-PBSA
- 0.25%粗制胰蛋白酶
- 待测定的化合物配成最大使用浓度的 10 倍，溶于无血清培养基中，检测溶液的 pH 和渗透压，必要时予以调整
- 培养瓶，$25cm^2$
- 培养皿，6cm 或 9cm，在皿底标记

非无菌

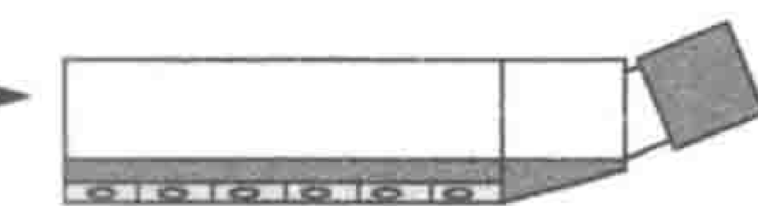
- D-PBSA
- 甲醇
- 1%结晶紫
- 血细胞计数板或电子细胞计数器

操作步骤

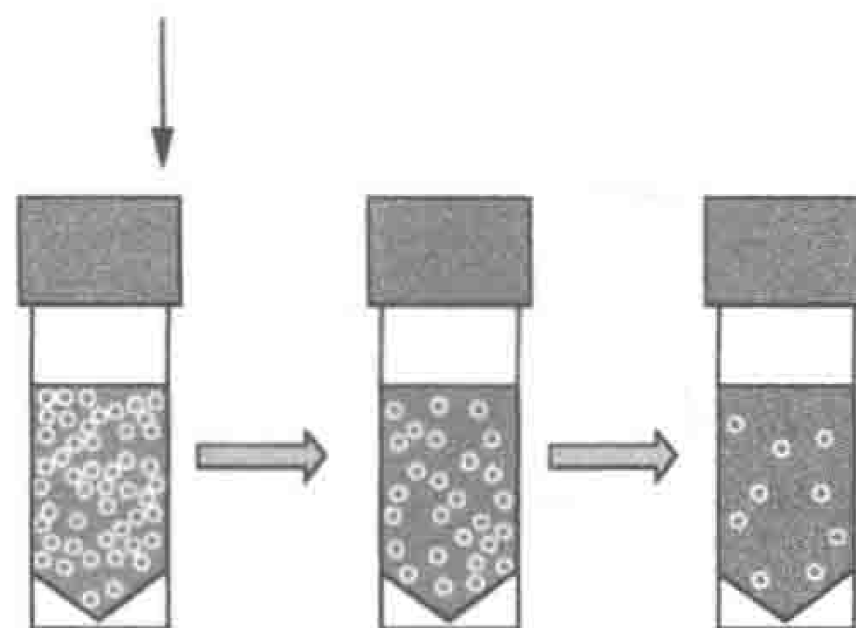
1. 准备一系列在 $25cm^2$ 培养瓶中培养的细胞，6 组试剂浓度，每组各 3 瓶，另有 3 组作对照。每个

培养瓶中接种 4.5mL 细胞悬液（细胞密度为每毫升培养基 5×10^4 个细胞），温育 48h，细胞将进入对数生长期（参见 23.9.2 节）。

对于高度或急性细胞毒素，根据细胞毒素的性质和细胞周期的持续时间，处理1~72h



用胰蛋白酶消化单层细胞，重悬并计数



连续稀释细胞悬液至10~200个/mL（以对照组的细胞计数为基准）

对低度或设定的慢性暴露，根据细胞毒素的性质，处理克隆培养物1~3周



温育1~3周（取决于生长速度）

细胞毒素的递增浓度

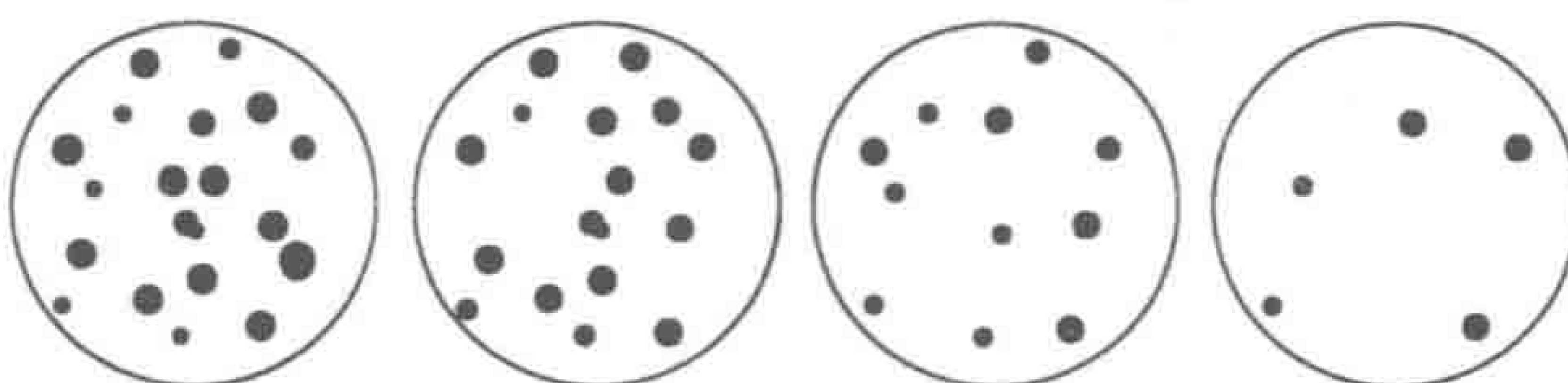


图 24.1 单层细胞克隆形成实验。细胞以胰蛋白酶消化、计数、稀释后做单层克隆实验（参见方案 16.1）和贴瓶率测试（参见方案 23.10）。受试物可于胰蛋白酶消化前或克隆化接种后加入（参见 24.3.2 节）。当集落生长到可用肉眼观察到但并未重叠生长时，将其固定并染色

2. 准备一系列待测物质的稀释液，每组 2mL，为所需终浓度的 10 倍。

(a) 若是首次测定的化合物，在 3~5 个对数生长范围内采用 5 倍稀释。

(b) 若能预测大致的毒性浓度，可以选择一个较窄的计算范围，每组相隔 10 或 20 个数量级。

3. 在每组浓度的 3 个培养瓶中各加入 0.5mL 10 倍浓度的待测化合物，从对照组（不含待测物质，但含有用于毒性测定的溶剂）开始，然后从最低浓度向最高浓度进行。

4. 将培养瓶放回孵育箱。

5. 若化合物作用缓慢或部分可逆，重复步骤 3 两次，即将细胞暴露在试剂中 3 天，每日更换培养基及化合物使其得以更新。若化合物作用快速，暴露 1h 就足够。

6. 依次将每组 3 瓶中的培养基弃去（从对照组开始，由最低浓度向最高浓度进行），用胰蛋白酶消化细胞并计数。

7. 将细胞稀释至克隆生长所需的密度（参见方案 16.1 和方案 23.10）并接种于培养皿中，稀释细胞，数量与对照组相同。从最高浓度的培养瓶至最低浓度组，最后稀释对照组。

8. 温育细胞至集落形成（通常需要1~3周）。
9. 用无水乙醇固定细胞，1%结晶紫染色10min（参见方案18.3）。
10. 用自来水清洗培养皿、吸去水分并倒置干燥。
11. 对超过50个细胞的集落（多于5个世代）进行计数。

存活曲线的分析

（1）计算每组药物浓度下的细胞贴壁效率（参见23.10.1节）。
（2）计算相对贴壁效率：每组浓度的贴壁率/对照组的贴壁率，即细胞存活分数。
（3）根据所用的浓度范围，在对数或线性浓度下，绘制细胞存活分数的对数曲线（图24.2）。

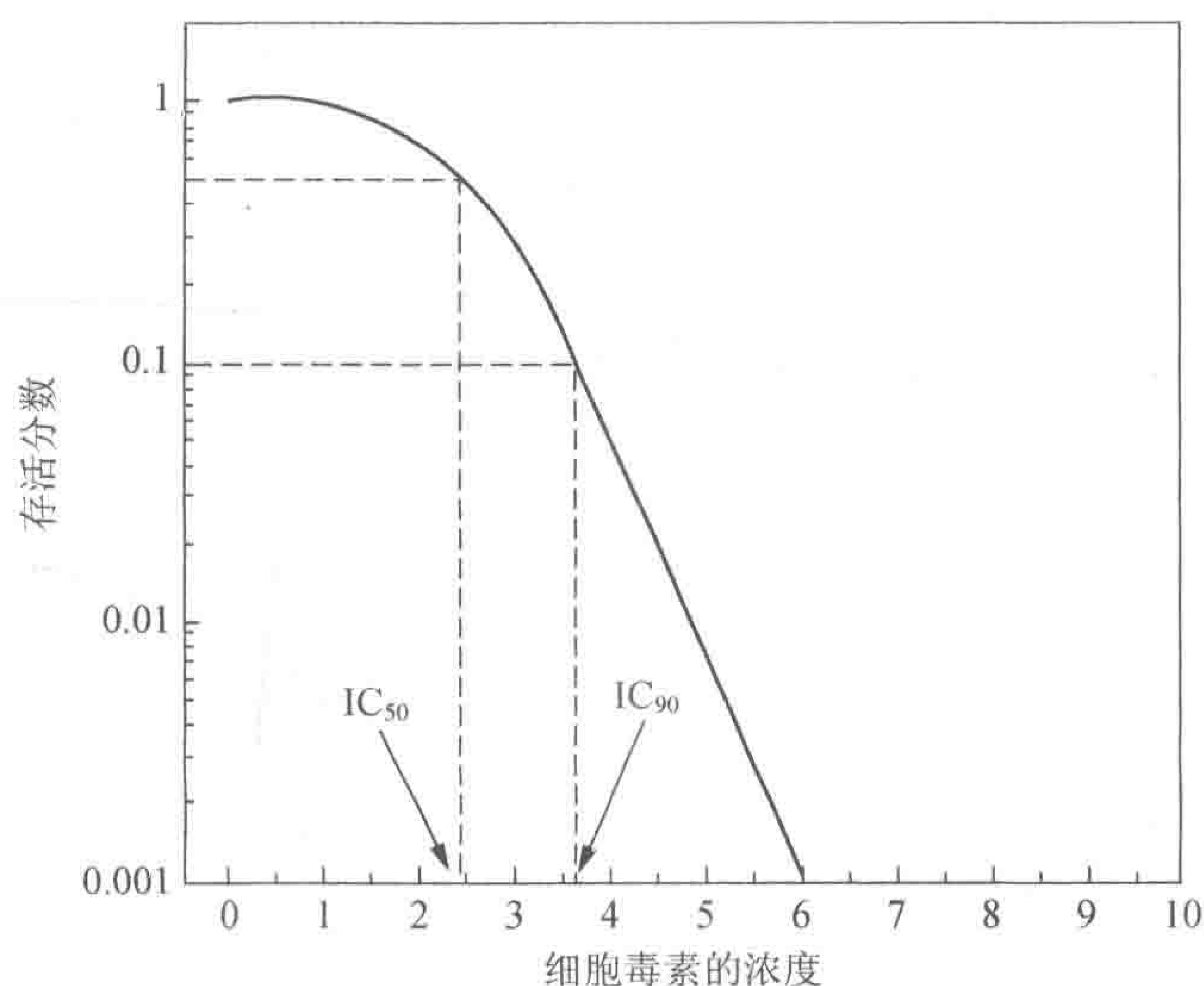


图24.2 存活曲线。细胞存活分数（实验细胞形成的集落/对照细胞形成的集落）对细胞毒素浓度的半对数曲线图。典型的曲线有一个"膝部"，IC_{90}位于曲线的线性部分，而IC_{50}位于膝部，其值不太稳定

（4）确定IC_{50}或IC_{90}，其分别是50%或90%的集落形成被抑制时的化合物浓度。由于是半对数曲线图，IC_{90}更为适合，因为其更可能落在曲线的线性部分；而IC_{50}通常落在曲线的弯曲部分，稳定性比较差。

（5）曲线的敏感性差异分析

（a）曲线的斜率和弯曲部分的长度。曲线的斜率较浅和（或）弯曲部分较长代表敏感性降低；斜率较陡和（或）弯曲部分较短代表敏感性增加。弯曲部分的长度及曲线斜率对IC_{50}和IC_{90}均有影响，而在IC_{90}可以观察到更为显著的差异（图24.3）。

（b）抵抗分数。细胞抵抗分数是指曲线下端的平坦部分。

（c）抵抗总数。缺乏曲线梯度代表所有细胞均有抵抗。

（d）曲线下面积。可以通过计算曲线下面积对复杂的生存曲线进行比较，但这样比较只是为了方便，并无数学根据。

存活实验测定的参数，有9个基本参数。

（1）试剂的浓度。初次实验应采用以对数增长的较宽的浓度范围（如1μmol/L~1mmol/L，对照）；接下来的实验可以根据首次实验结果采用较窄的浓度范围（对数或线性）。

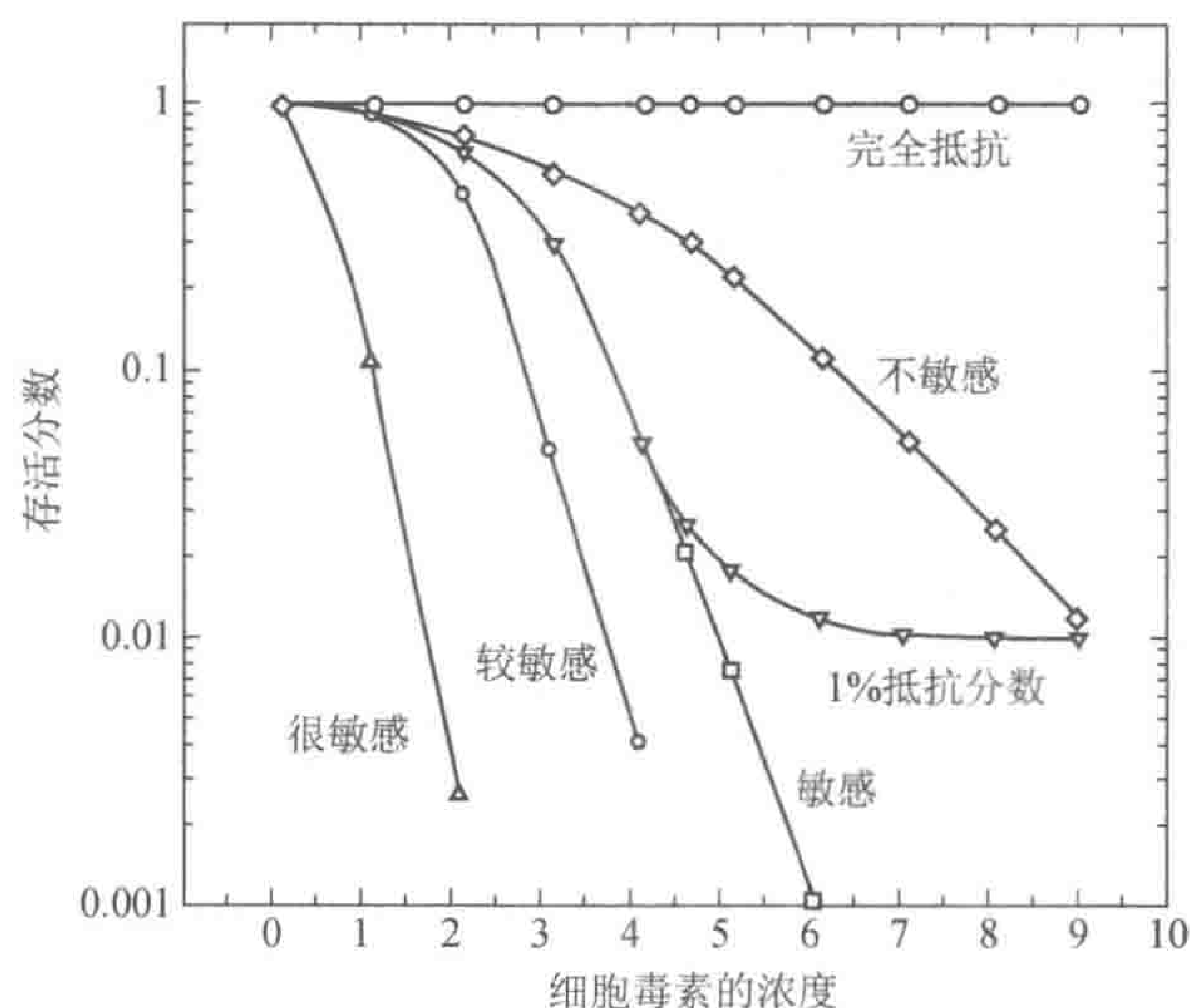


图 24.3 存活曲线的解释。存活细胞对细胞毒素浓度的半对数曲线图。曲线斜率随敏感性的增加而增加，随其降低而降低；当具有完全抵抗时，整个曲线变平坦。部分有抵抗可用抵抗分数表示，表现为曲线低端的平坦处

（2）不变的试剂浓度。某些实验条件不易改变，如培养基、水或不溶性塑料制品的质量。在这些情况下可以改变血清的浓度，因为血清对较小的毒性效应可能有屏蔽作用，此效应可能仅在限制血清的实验中才能显示出来［参见“（7）培养基的成分效应”和图 24.4b］。

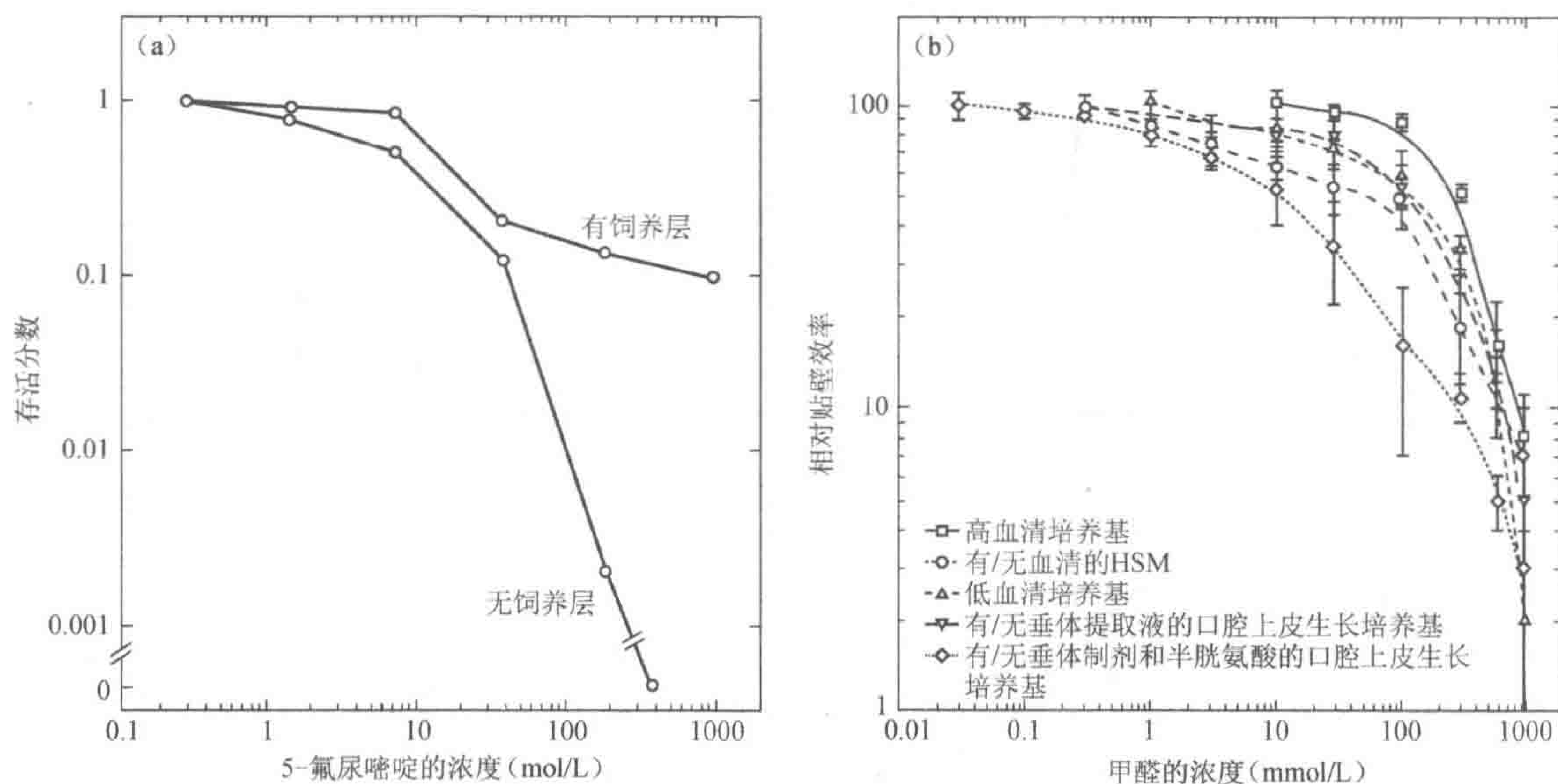


图 24.4 培养条件对细胞存活的影响。（a）细胞密度：用不同浓度的 5-氟尿嘧啶处理人胶质瘤细胞，然后将它们分别接种于饲养层（虚线）和非饲养层（实线）上。有饲养层时，10^{-4}mmol/L 药物作用后，10%的抵抗分数很明显。没有饲养层时，构成抵抗分数的少量集落不能单独存活；（b）培养基的成分：含高血清的培养基（HSM，实线与方块）与不含血清的培养基（虚线和圆圈）相比，血清可以使 IC_{50} 升高 5 倍；去除半胱氨酸可以使 IC_{50} 降低 10 倍（数据引自 Nilsson et al.，1998）

（3）暴露在试剂中的持续时间。有些试剂起作用很快，而另一些则慢得多。例如，暴露于离子辐射时，仅需几分钟即可达到所需剂量；而要测试某些周期依赖的抗代谢药物，则可能需要数

日才能达到可测量的效应。虽然 $C\times T$ 并不总是常数，但暴露的持续时间（T）与药物浓度（C）依然相关。每日换药可以延长暴露时间从而增加敏感性，其比 $C\times T$ 的预计值高，这是由细胞周期效应与累积损伤所致。

（4）试剂的添加时间。如果试剂是可溶的且估计具有毒性，应依照方案 24.3 进行。如果试剂的性质未明，且估计有刺激性或仅有微小效应（例如，20%的抑制作用而非数倍作用），则试剂可在克隆生长过程中加入，而不必进行预孵育。我们需要进行很谨慎的实验来确定预期毒性（如细胞毒药物），即在克隆胰蛋白酶消化前的培养中使用与体内相当的最少药物。还需要更严格的实验来确定药物不具毒性（如自来水或一种无毒药物），在克隆接种及生长期间要延长暴露时间。毒性药物应每周更换，每日换药会降低克隆效率。

（5）暴露期间的细胞密度。暴露在试剂中的细胞密度可以改变细胞与试剂的反应，如 HeLa 细胞在高密度时对烷化剂甲基氮芥不敏感（Freshney et al.，1975）。

（6）克隆期间的细胞密度。集落的数目在毒性试剂浓度高的时候会降低，但接种更多细胞可能会弥补这种效应，因此每种药物浓度下形成的集落数目可以基本相同。此步骤可以消除低密度克隆对细胞存活的威胁，并提高统计学方面的可信度。但也容易产生误差，因为较高浓度药物作用下的细胞需要以较高密度接种，而这也可能是影响细胞存活的因素。还有一种方法更为可取，将细胞以 5×10^3 个/cm^2 的密度接种在预先形成的饲养层上，此密度远远超过了克隆细胞的密度从而保证了细胞密度的一致性，因为其对总的细胞密度几乎没有影响，所以无需考虑克隆的存活。需要注意的是，饲养层的克隆有时可以显示部分有抗性的细胞，而在非饲养层则并不明显（图 24.4a）。

（7）培养基的成分效应。细胞对毒性的反应也受培养基成分影响，因为不同的培养基有不同的增殖效应，而且不同的成分对于毒素的稳定、结合和代谢均有影响。例如，血清可以降低甲醛对口腔上皮细胞毒性的 5 倍，而半胱氨酸可以降低 10 倍（图 24.4b）。血清蛋白可以与毒素结合，使其无法影响细胞生长；半胱氨酸和其他巯基可以与细胞内和培养基中的活性化合物结合，从而起到解毒的作用（Nilsson et al.，1998）。半胱氨酸可以发生自氧化，培养基的使用期限会因此发生变化（Grafström，个人通讯）。

（8）集落大小。一些试剂可以抑制细胞生长（也就是抑制细胞增殖），但是没有细胞毒性，当持续暴露于这些试剂中时，集落的体积会变小，但数目不会减少。在这种情况下，可以应用密度计量法（McKeehan et al.，1977）、自动集落计数或肉眼计数每个集落的细胞数来确定集落的体积。进行集落计数（即存活数）时，每个集落细胞数的阈值（例如，在方案 24.9 中为 50 个）是完全主观的，通常假定大多数集落的细胞数都远超过阈值。当集落生长到相当大时（$>1\times10^3$），其生长速度会减慢，而那些仍然存活的较小集落的生长速度则会超过这些较大的集落。若要测定集落大小，可以在较大集落的生长速度减缓之前对培养物进行染色，然后计数所有的集落。

（9）溶剂。某些待测试剂在水性溶剂中溶解度很低，必须用有机溶剂使其溶解。常用的有机溶剂有乙醇、丙二醇、二甲基亚砜，但这些溶剂本身可能对细胞有毒性，因此在配制溶液时应当用最低浓度的溶剂。例如，待测试剂以高浓度溶于 100%乙醇中，然后用 BBS 逐渐稀释，使培养基中溶剂的终浓度<0.5%，还应包括溶剂的对照（即不含待测试剂的相同终浓度的溶剂）。

对于有机溶剂应谨慎使用塑料或橡胶制品。未经稀释的有机溶剂最好用玻璃器材，当溶剂浓度<10%时再使用塑料制品。

虽然计算贴壁效率是测定细胞存活率的最好方法之一，但要切记的是，贴壁效率只适用于细胞群体中有克隆形成能力的那些细胞，它不能代表整个细胞群体。如果对照组的多半贴壁效率是 100%当然不会出现问题，然而，实际上对照组的贴壁效率多半为 20%或更低，所以所测定的反

应只是整个细胞群体中一个部分的状态。

24.3.3 细胞增殖测定

若要测定各种化合物对细胞增殖的作用，可以在培养数天后进行细胞计数。由于单个时间点的细胞计数是不确切的（图 23.10，第 7 天），因此在实验的早期阶段，还是需要绘制一条完整的生长曲线（参见方案 23.7~方案 23.9）。尽管在多孔板上利用图像分析（Incucyte；Chip-Man；见 23.9.3 节，图 23.11、图 23.12）自动描绘生长曲线也是可行的，但在大量筛查时还是会很麻烦，所以在标本数目相对较少时，利用细胞计数进行生长曲线分析是最可行的。

当标本数目很多时，可以采用单个时间点（如暴露 3~5 天的细胞数目），应把时间选择在对照组细胞的对数生长期，最好是中间部分。对于任何显著作用效应，应该由整个生长周期的完整生长曲线来支持，或者换一种测定方法，如克隆形成实验的生存曲线（参见方案 24.3）或 MTT 测试（参见方案 24.4）。

24.3.4 代谢性细胞毒性测定

贴壁效率实验的建立和分析既耗时又费力，有大量标本时更是如此（尽管可以自动化进行，见 23.10.2 节），每个实验周期可能需要 2~4 周。此外某些细胞系贴壁效率很低，尤其是新鲜分离的正常细胞，因此人们又设计出很多方法在更高的细胞密度进行测定（如微滴定板，见 24.3.5 节）。然而这些方法并非直接测定细胞存活，而是测定细胞数目的净增长（也就是生长量，见 24.3.3 节）、蛋白质或 DNA 总量的增加，或者持续的代谢活性，如四唑氮盐（MTT 或 XTT）还原成甲臜、合成蛋白质或 DNA 的能力。在这些情况下，存活可以看作一个整体的细胞群体在去除了毒性影响后的某段时间所保留的代谢或增殖能力。然而，不能通过这类实验区别是每个细胞代谢或增殖活性的降低，还是细胞数目的减少。因此，任何新的或额外的观测结果，都应当用克隆形成存活实验加以确认。

24.3.5 微滴定实验



彩版 17

组织培养中标本复制的方法因为多孔板的应用而发生了巨大改变，多孔板使用经济、适于自动操作且视觉效果好。其中最常用的是 96 孔微滴定板或微型板（彩版 17b），每个孔的生长面积为 28~32mm^2，可容纳 0.1mL 或 0.2mL 培养基，可达 1×10^5 个细胞。微滴定提供了一种可以同时处理大量样品的方法，且每个样品所需的细胞数相对较少。应用此方法时，整个细胞群体暴露在试剂中，然后测定其活性，通常是测定某种代谢参数，如 ATP 或 NADH/NADPH 浓度，有试剂盒可供使用（参见补充材料中的附录Ⅲ：细胞毒性测定）。

随着自动化分析方法的引入，如荧光染色或者化学发光法，我们能够在一块板子上测很多孔，现在已经有 384 孔板（Corning）甚至 1536 孔板（Greiner Bio-one），这样就可以实现高通量的分析（参见 21.5.2 节）。以下的描述都是使用 96 孔板。

在去除毒性物质以后，微滴定实验的终点通常是估算存活细胞的数目。尽管此结果可以通过细胞计数直接获得，或是通过同位素掺入等方法间接获得，但 MTT 还原反应（Mosmann，1983）还是目前应用最广泛的方法（Cole，1986；Alley et al.，1988）。MTT 是一种黄色的水溶性四唑氮

燃料，活细胞可以将其还原为紫色的不溶于水的甲臜产物，而死细胞则不能。然而此还原反应受很多因素影响（Vistica et al.，1991）。方案24.4描述的方法由英国苏格兰格拉斯哥大学肿瘤与应用药理研究中心的 Jane Plumb 提供，现已证明其与标准的克隆形成实验所得的结果是相同的（Plumb et al.，1989）（也见于24.3.6节）。此方法阐明了微滴定在抗肿瘤药物测定中的应用，只要稍作修改，该方法就适用于所有细胞毒性实验。

方案24.4 基于MTT的细胞毒性实验

感谢苏格兰格拉斯哥大学肿瘤和应用药理学的UK癌症研究中心Jane Plumb提供的帮助。

原理

将指数生长期的细胞暴露于细胞毒性药物中，产生最大损伤所需的时间决定了暴露的持续时间，但其也受药物稳定性的影响。撤除药物后，让细胞再增殖2~3个群体倍增时间（PDT），能够增殖的存活细胞与不能增殖的存活细胞就可以区分开。用MTT染料还原反应间接测定存活细胞的数目。只要MTT-甲臜产物溶于适当溶剂中，就可以用分光光度法定量。

概要

将不同浓度的药物加入到微滴定板上的单层细胞中温育（图24.5），去除药物后，每日换液至2~3个PDT，再次换液，将MTT加入每个孔中。在暗处温育4h后去除培养基和MTT。将不溶于水的MTT-甲臜结晶溶于DMSO中，加入缓冲液调至终pH，在ELISA读板仪上记录吸光值。

材料

无菌

- 生长培养基
- 胰蛋白酶（0.25%+EDTA，1mmol/L，溶于PBSA中）
- MTT：3-（4,5-二甲基-2-噻唑）-2,5-二甲苯基溴化四唑，50mg/mL，过滤除菌
- Sorensen甘氨酸缓冲液（0.1mmol/L甘氨酸，0.1mmol/L NaCl，用1mmol/L NaOH将pH调至10.5）
- 微滴定板（Iwaki）
- 微量吸头，最好放在高压灭菌的吸头盒中
- 5cm和9cm培养皿（未经TC处理的），或储液器（Corning）
- 30mL和100mL通用容器或试管

非无菌

- 塑料盒（无毒的聚苯乙烯，用来装培养板）
- 多道加样器
- 二甲基亚砜（DMSO）
- DMSO分装器（可以任选）：如Labsystems Microplate Dispenser（Cat No 5840 127，Thermo Fisher；另见图4.7）

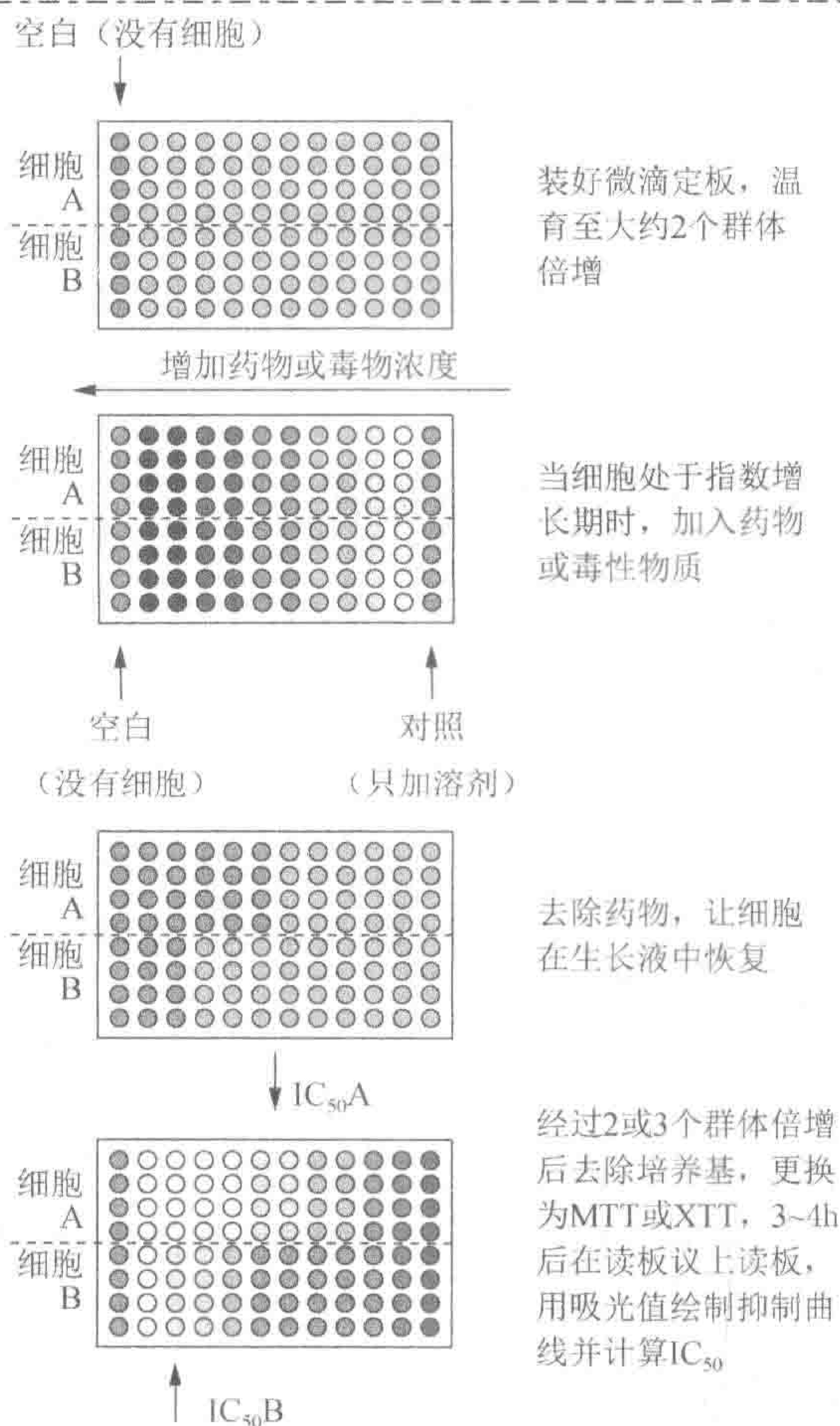


图 24.5 微滴定实验。微滴定实验的各阶段，将两个不同的细胞系暴露于同一药物的系列浓度下，然后让其恢复，用 MTT 还原反应估算其存活（参见方案 24.4）。最左侧一列不含细胞，作为空白对照调零读板仪。将全部孔封闭后即可操作，此时所有孔是相当的。若不封闭而是用盖子，则可能由于蒸发而产生边缘效应，因此最好略去最左与最右侧纵列对照孔（例如，只加入培养基，见方案 24.4），也有研究者将最上与最下两排孔作为空白对照（参见彩版 17b）


彩版 17

- ELISA 读板仪（Molecular Devices，with SOFTmax PRO；另见图 4.7；补充材料中的附录III：读板仪）
- 离心用的板架（用于悬浮生长的细胞；见补充材料中的附录III：微滴定板离心）

操作步骤

接种细胞

1. 用胰蛋白酶消化汇合的单层细胞，将细胞收集到含血清的培养基中。
2. 离心细胞悬液（5min，200g）使细胞沉淀，用培养基重悬细胞并计数。
3. 根据细胞系的生长速度，将细胞稀释至（2.5~50）$\times10^3$ 个/mL，每个微滴定板可以容纳 20mL 细胞悬液。
4. 将细胞悬液移至 9cm 培养皿中，用多道加样器在平底 96 孔板中央 10 列的各个孔中加入 200μL 细胞悬液（每板 80 孔），从第 2~11 列，每孔加入 0.5×10^3~10×10^3 个细胞。

5. 在第 1 列与第 12 列的 8 个孔中加入 200μL 培养基，第 1 列作为读板仪的空白对照，第 12 列用作维持第 11 列的湿度并将“边缘效应”减至最小。

6. 将培养板放入塑料饭盒中，于 37℃湿润环境中温育 1~3 天，细胞进入指数生长期时加入药物。

7. 对于非贴壁细胞，用新鲜培养基制备细胞悬液，将细胞稀释至（5~100）$\times10^3$ 个/mL，仅取 100μL 细胞悬液接种于圆底 96 孔板并立即加入药物。

添加药物

8. 用培养基将细胞毒性药物 5 倍系列稀释，共制备 8 个浓度。选择浓度的标准应为最高浓度下多数细胞被杀死，而最低浓度时不会杀死细胞。对药物的毒性有所了解就可以采用较小的浓度范围。一般情况每种药物使用 3 块培养板，使得一次实验可以有 3 个平行测定结果。

9. 对于贴壁细胞

（a）去除第 2~11 列各孔中的培养基，可以通过将皮下注射器连在吸引管上完成。

（b）在第 2 列和第 11 列的 8 个孔中加入 200μL 新鲜的培养基作为对照。

（c）将药物溶液移至 5cm 培养皿中，用 4 道加样器向每组的 4 个孔中各加入 200μL。

（d）在第 3~10 列细胞中加入细胞毒性药物，每个药物浓度仅需 4 个孔，这样第 A~D 行可用于第一种药物，第 E~H 行用于第二种药物。

10. 对于非贴壁生长的细胞，按照步骤 9（b~d）进行，将药物稀释至预期终浓度的 2 倍，取 100μL 加入已含 100μL 细胞的孔中。

11. 将培养板放入塑料盒中温育至确定的暴露时间。

生长期

12. 在药物暴露期结束时，将所有含细胞的孔中的培养基去除，加入 200μL 新鲜培养基。若是非贴壁细胞，将培养板离心（5min，200g）使细胞沉淀，用细针头吸去培养基以免扰动细胞沉淀。

13. 每日换液至 2~3 个 PDT。

存活细胞数的估算

14. 在生长末期，每孔中加入 200 μL 新鲜培养基，第 1~11 列所有孔中各加入 50μL MTT。

15. 用铝箔包裹培养板，于 37℃湿润环境中温育 4h。注意 4h 是所需的最短温育时间，可延长至 8h。

16. 弃去孔中的培养基和 MTT（非贴壁细胞应离心），第 1~11 列所有孔中各加入 200μL DMSO，以溶解残留的 MTT-甲臜结晶。

17. 含 DMSO 的各孔中加入甘氨酸缓冲液（每孔 25μL）。

18. 因为产物不稳定，应立即在 570nm 处记录吸光值。读板仪第 1 列中含培养基和 MTT 但不含细胞的各孔用来调零。

MTT 实验分析

（1）以药物浓度为横坐标（*x* 轴），吸光值为纵坐标（*y* 轴）绘制曲线图。

（2）第 2 列和第 11 列各孔中所得的平均吸光值作为对照吸光值（图 24.5 中的封闭板，用第 1 列和第 12 列），对照组吸光值减少一半时所需的药物浓度为 IC_{50} 浓度。对照组的吸光值应该是相同的。偶尔结果并非如此，表明整个板中接种的细胞数并不一致。

（3）用吸光值的绝对值作图，以此才能与对照吸光值相比较。然后将数据转化为百分率抑制曲线（图 24.6），从而使一系列曲线标准化。

MTT 实验的其他变数

其他应用。一种类似的测定方法也可以用于确定细胞的放射敏感性（Carmichael et al.,

1987b）。除细胞毒性药物处理以外，MTT 还可以用于测定多种方法处理后（如生长因子刺激后）的细胞数目。然而，在这些情况下，必须确保细胞还原染料的能力不受处理本身的影响，且细胞数目的吸光值应处于线性范围内。

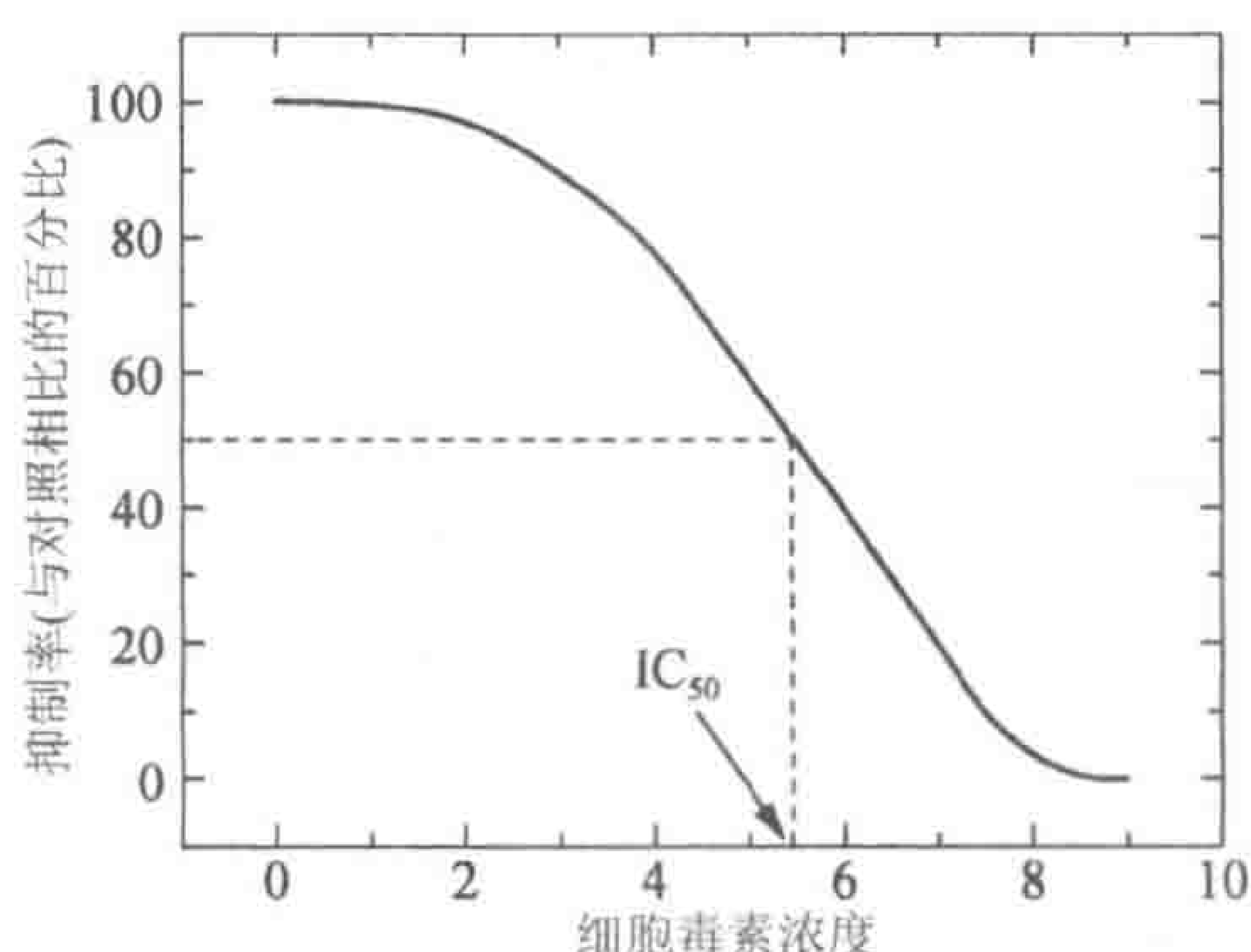


图 24.6 百分率抑制曲线。以测试孔的值作为对照百分数进行计算，然后对细胞毒素浓度作图。典型的曲线呈“S”形，理想状态下 IC_{50} 位于曲线弯曲部分的中央

药物处理的持续时间。与克隆形成实验（参见方案 24.3.2）一样，某些试剂可能起效较快，其作用时间及恢复时间就可能缩短。在整个过程中，细胞必须处于指数生长期（参见 12.5.3 节、23.9.2 节），细胞的终浓度应处于 MTT 光密度测定的线性范围内。对于第一次使用的细胞系，应设立平行对照板对细胞进行计数并绘制生长曲线（参见方案 24.4），并测定 MTT-甲臜吸光值，确保吸光值与细胞数目成正比。如果生长曲线显示细胞正移向平台期，或对细胞浓度作图时吸光值不呈线性，可将实验缩短，直接进行方案 24.4 中的步骤 14。

药物处理的持续时间与细胞在作用和恢复期间所经历的细胞周期数相关。选择短期实验还是长期实验要受到细胞周期时间的影响（图 22.7、图 22.8）。对于分化快的细胞，在处理期间细胞密度会较快地增长，而且对周期依赖性药物的反应也较快。在首次应用某种实验方法时，最好在药物作用及恢复的每一天都采样。如果能较早达到稳定的 IC_{50}，可以将实验缩短（图 24.7、图 24.8）。

终点。XTT 与 MTT 相似，但它能生成可溶性的甲臜，这种可溶性的甲臜不需要使用 DMSO 来溶解，这种方法称为 XTT 分析（ATCC）。磺基罗丹明是一种染蛋白质的荧光染料，也可以用于荧光检测来估算读板仪上各孔中蛋白质（也就是细胞）的量（Boyd，1989），它可以使所有细胞都被染色，因此无法区别活细胞与死细胞。[^{3}H] 胸腺嘧啶（DNA 合成）、[^{3}H] 亮氨酸（Freshney et al.，1975）或 [^{35}S] 甲硫氨酸（Freshney and Morgan，1978）（蛋白质合成），或其他同位素

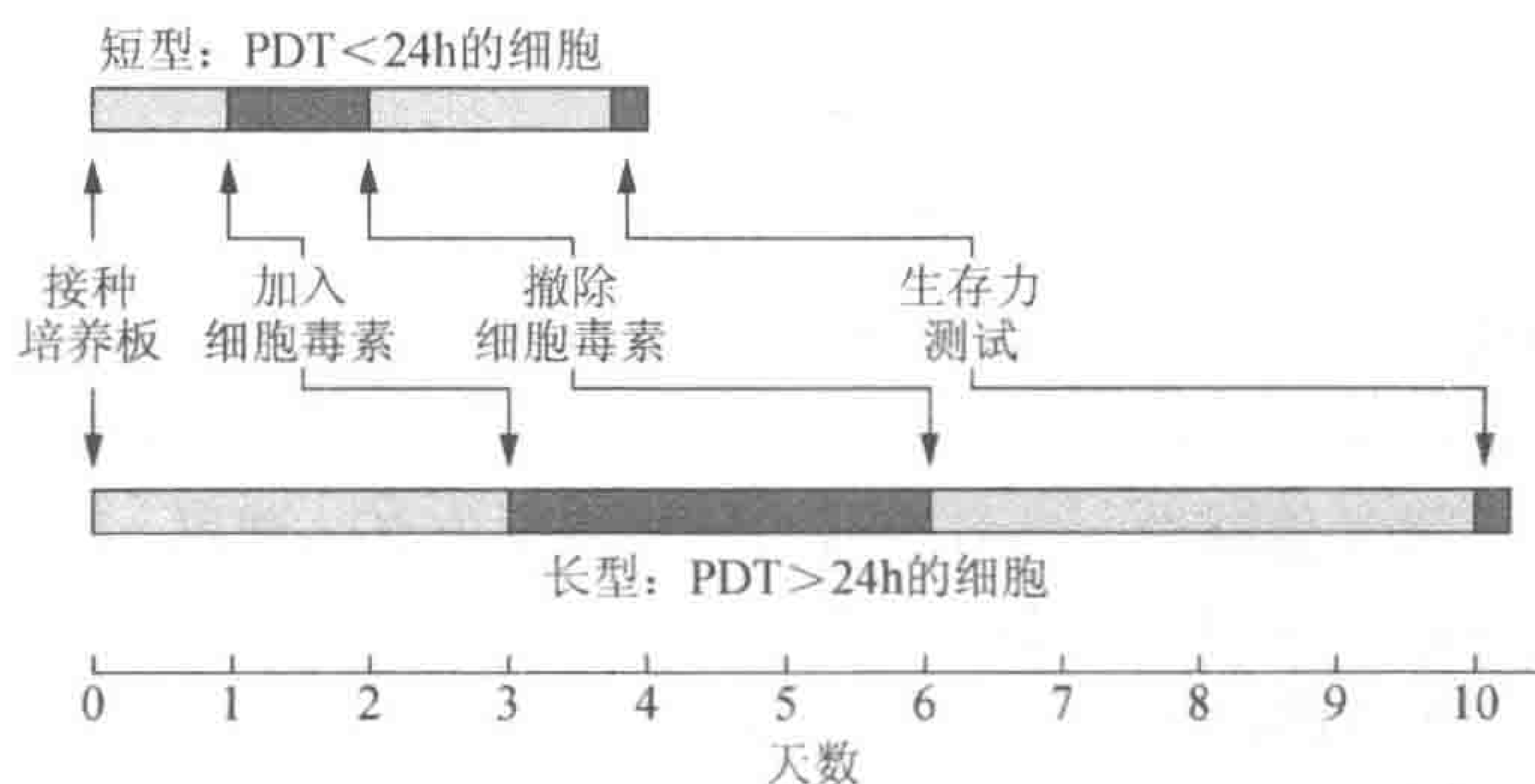


图 24.7 持续时间的实验。短期和长期的实验模式。上图描述了适用于 PDT<24h 的细胞的实验，下图描述了适用于 PDT>24h 的细胞的实验，但也有可能处于中间时间段

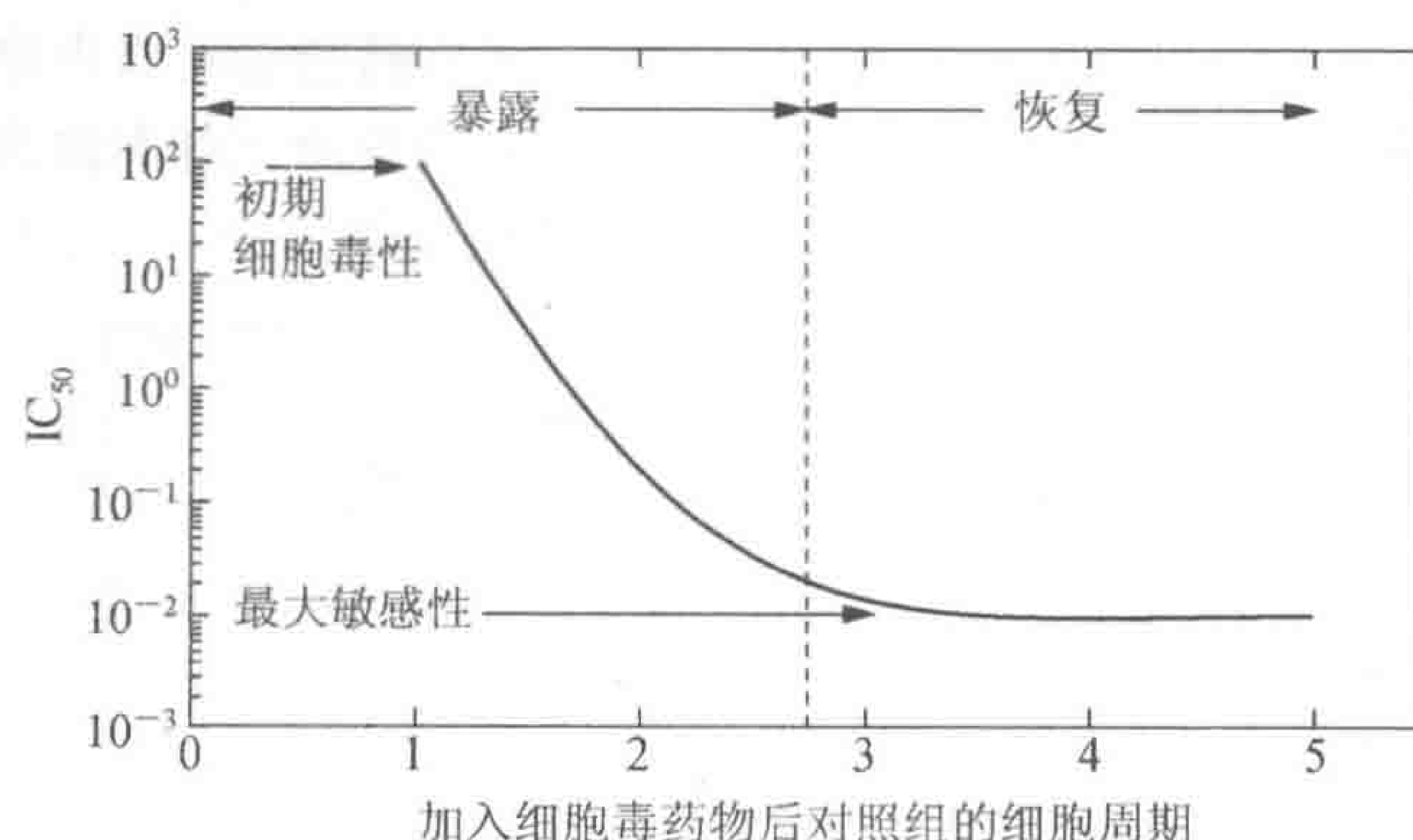


图 24.8 IC_{50} 下降的时间进程。试剂的细胞毒性随时间递增的理想曲线，3 个细胞周期后达到最大效应。并非所有的细胞毒性药物都符合此模式（Freshney et al.，1975）

标记可以代替 MTT 还原反应。用微滴定板可以进行定量，可以用一块特制的闪烁计数仪（Perkin Elmer）计数，也可以准备一张自动荧光谱图进行计数（Freshney and Morgan，1978）。

处理技术。目前有很多自动处理技术可以缩短对每个样品操作所需的时间，如自动分配器、稀释器、细胞收获器和可编程的读板仪（参见图 4.7；补充材料中的附录Ⅲ：微滴定设备）。

在实际应用时，实验最后用什么标准来确定细胞活力或存活并不重要，实验的设计才是至关重要的，如药物处理和恢复时间、生长周期（细胞密度、生长速率等）。在短暂或无恢复期的实验中，终点仅仅测定有活力的细胞（如 MTT）；但在长期的实验中，终点测定的是细胞增殖孔、无增殖孔或增殖减少孔之间的差别。至少在单层细胞实验中，无活力的细胞将被丢掉，测定的是相对于对照孔增殖或减少的细胞。无论是 MTT 检测、磺基罗丹明荧光检测，或者是同位素标记的 DNA、蛋白质的测定，都将变得不重要。

24.3.6 微滴定与克隆存活的比较

在微滴定与克隆这两种技术中，尽管细胞数量是基本相同的，但微滴定中每个样品所需培养基的体积比克隆中的 1/50 还要少。微滴定还能缩短实验时间，易于自动化操作、数据的收集和分析。然而，微滴定不能将一个群体中细胞间的不同反应和每个细胞的反应程度加以区别，例如，一个代谢参数 50%的抑制，可能表示 50%的细胞有反应，也可能指每个细胞均被抑制了 50%。但这对于延长恢复期的实验并不重要，细胞繁殖的相对提高才是存活的关键指标。

比较微滴定和贴壁效率实验中得出的 IC_{50}，这两种方法在抗肿瘤药物测试中有很强的相关性（图 24.9）（Morgan et al.，1983；Plumb et al.，1989），但 IC_{90} 的相关性则不紧密。

微滴定实验（尤其是以比色或放射测定作为终点的实验）的一个显著特征是可以得到大量数据，且这些数据都采用易于计算机分析的格式（参见 23.8.1 节、23.8.2 节）。然而，扫描原始数据及经过简化的实验终点数据依然是非常重要的，因为计算机在处理异常数据点时会作出不同的假设与修正，当然这一点并不明显，除非根据原始数据进行仔细检查。

24.3.7 药物的相互作用

细胞毒性研究经常涉及不同药物的相互作用。药物的相互作用很容易通过微滴定系统进行测

定，其可以同时测定几种不同比率的相互作用的药物。进行药物相互作用分析时，可以用等线图（isobologram）来解释数据（Chou，2006），直线图表示加成反应。对于曲线图而言，若曲线在预期线之下表示协同作用，若曲线在预期线之上则表示拮抗作用。

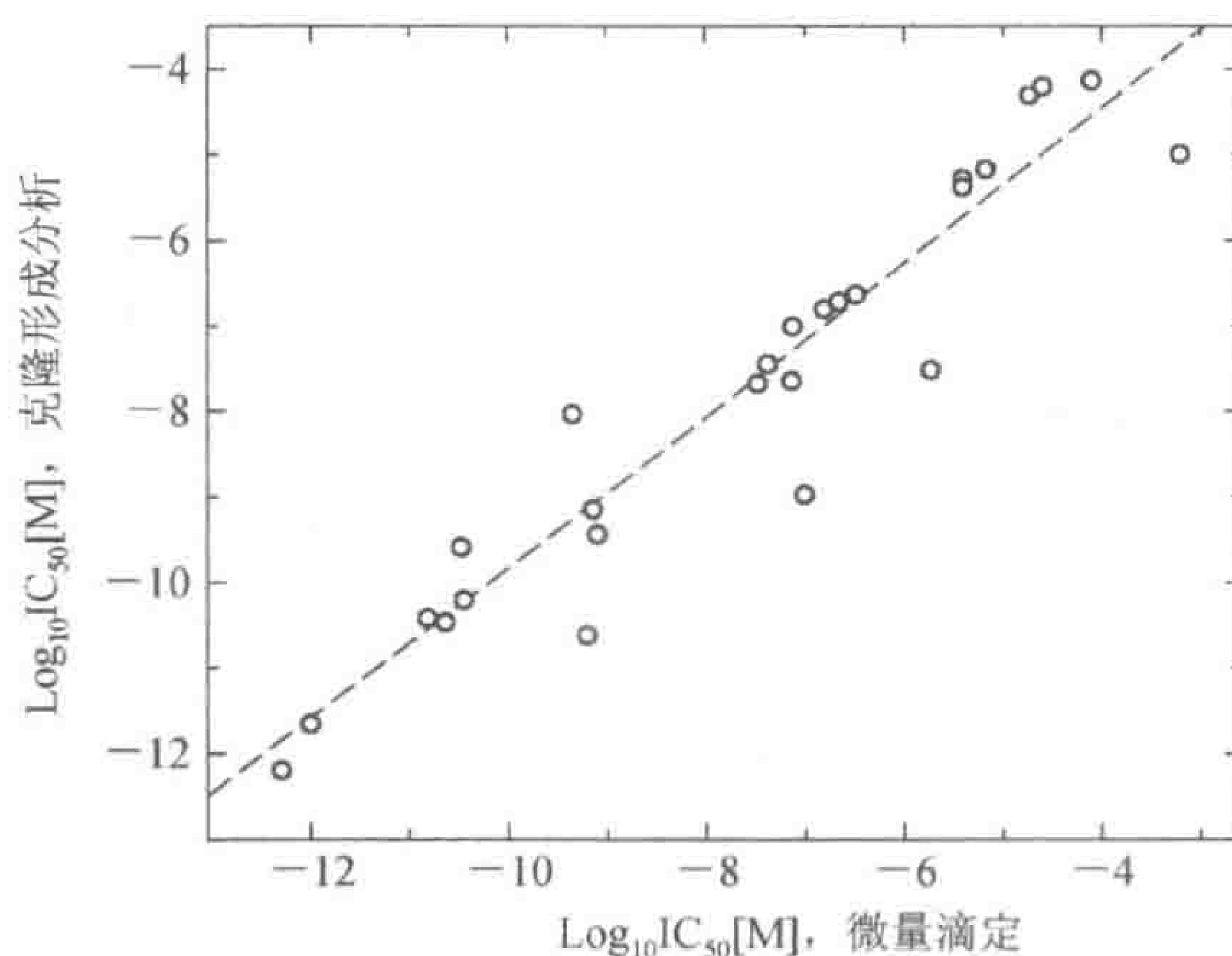


图 24.9 微滴定与克隆性存活之间的相关性。 5种人胶质瘤细胞系和6种药物（长春新碱、博来霉素、VM-26 epidophyllotoxin、5-氟尿嘧啶、甲基 CCNU、光神霉素）的 IC_{50} 测定。多数偏离的点来自一种细胞系，后来证明是多种细胞类型的混合物。虚线表示异源细胞系的数据点忽略不计后作出的回归。微滴定 IC_{50} 是由［^{35}S］甲硫氨酸标记得出的（Freshney and Morgan，1978；Freshney et al.，1982）

24.4 细胞毒性实验的应用

24.4.1 抗癌药物筛选

新型抗癌药物的筛选是一个烦琐的过程，且发现新活性化合物的方法也不多。目前的趋势更倾向于应用高通量筛选对特定分子靶标的作用进行监控。然而，也有人尝试应用快速且易于自动化的方法来提高筛选效率，例如，以 MTT 染色来确定活细胞数目为基础的方法（Mosmann，1983；Carmichael et al.，1987a；Plumb et al.，1989）。为了进一步简化操作，可以省略 MTT 孵育这一步，改用磺基罗丹明 B 测定总蛋白量作为终点（Boyd，1989）。虽然这种方法比 MTT 测试迅速易行，但必须记住那些不能存活更不能繁殖的细胞也能被染色，因此在检测活性时要用更可靠的指标来证实，如克隆形成或 MTT 还原反应。

24.4.2 肿瘤药物的前瞻性实验

通常要考虑到，对患者肿瘤细胞化学敏感性的测定可能会用于患者化疗方案的设计（Freshney，1978）。虽然小规模临床试验的结果令人振奋，但这项技术从未经过全面检验（Hamburger and Salmon，1977；Bateman et al.，1979；Hill，1983；Thomas et al.，1985；Von Hoff et al.，1986）。目前需要建立一种可靠的、可重复的培养技术，能用于多数常见的肿瘤（如乳腺癌、肺癌、结肠癌），因此需要常规制备能增殖数个细胞周期的纯肿瘤细胞的培养物。瘤体内的多种细胞生存期有限，但化疗的主要目标是针对具有无限增殖能力的细胞（Al-Hajj et al.，2004；Jones et al.，2004）。干细胞识别技术（参见26.1节；短篇综述26.1和26.2）可以分离出肿瘤干

细胞（参见短篇综述 26.3）。软琼脂集落形成实验（Hamburger and Salmon，1977）分离转化的干细胞被人们寄予希望，虽然开始时令人鼓舞，但其分离出的集落不具备长期的再生能力（参见短篇综述 26.3）。目前尚无常规技术能分离出长期增殖的肿瘤细胞群体。然而当抗肿瘤药物的靶向性和特异性得到改进时，前瞻性实验将更有意义。将会有更高比率的患者参与实验，接受活检的两周内即可进行药物实验，基因谱将用于帮助筛选可能有效的药物。

然而主要的问题是获得患者。肿瘤细胞必须满足下列条件：①在体外要长到可以实验的程度；②要对药物有反应；③产生的反应可以重复。能满足这些条件的患者数量非常少，因此用任何体外实验预测反应，甚至检验实验的可靠性都是非常困难的。体外的不敏感性和无应答之间的相关性很高，但很少有医生会因为体外实验而不用化学治疗，尤其是待测药物不是单独使用的情况下。最终更为有用的方法可能是分离肿瘤干细胞并用特定的分子靶标对其进行表达分析筛选，再用体外细胞毒性实验予以支持。

24.4.3 药物学实验

许多医药公司都坚持运用一系列体外测试程序，认为其比动物测试更经济，且在伦理上更被接受。现行的体外动物模型测试法规很难反映药物在人体内所产生的众多复杂反应。然而政治压力（如立法）需要有关人员进行大范围的对照调查，以确定哪些测试更为人们所接受（Knight and Breheny，2002；Vanparys，2002；ECVAM，2015；Hartung and Daston，2009）。

24.5 基因毒性

基因毒性是指 DNA 损伤（形成突变）导致基因表达的永久性改变（转化），甚至可能导致恶性变（肿瘤形成）。DNA 应答通常伴随 *p*53 及相关基因的表达增加，这些基因的改变可以用于检测基因毒性（Gentronix）。常用的体外转化实验包括锚定非依赖性（参见 22.4.1 节）、细胞增殖的密度极限降低（参见 22.4.2 节）及诱变（参见表 22.1 和补充材料中的附录Ⅲ中的基因毒性测试）。

24.5.1 姐妹染色单体交换的诱变实验

姐妹染色单体交换（SCE）是指细胞周期的 S 期内，姐妹染色单体间相同位点上的 DNA 片段发生相互交换。与染色体断裂相比，SCE 是一个更敏感的诱变活性指标，已成为诱变研究的一种主要工具（Latt，1974）。

本章补充材料中的方案 24.5-Su 详细介绍了姐妹染色单体交换实验。

24.5.2 致癌性

对致癌作用进行体外实验的潜力是很大的（Berky and Sherrod，1977；Grafström，1990a，1990b；Zhu et al.，1991；Tweats et al.，2007），但在这一领域进行体内实验很不适合，因为其模型很少，且实验通常需要花费几周甚至几个月的时间。建立满意的体外实验将受到以下因素的限制：①体外恶性转化缺乏通用的可以接受的标准；②作为靶标的人类细胞的遗传稳定性。

到目前为止，多数为人们普遍接受的实验都假定致癌作用在多数情况下是与致突变作用相关的（参见22.2节）。这一假设是用Ames实验作为基础（Ames，1980），该实验用细菌作为靶标，用肝微粒体酶系对其进行活化。Ames实验具有很高的预测价值，但由于在吸收、敏感性及细胞应答类型上的不同，又引入了另外一些实验方法如姐妹染色单体交换，这些方法以哺乳动物和人类的细胞作为靶标（参见方案24.5-Su）。

这些实验中有些也是致突变实验，用L5178Y淋巴瘤细胞悬液作为靶标（Cole et al.，1990），以突变诱导或逆转或姐妹染色单体交换的细胞学证据（参见方案24.5-Su）作为诱变的证据。也有人（Styles，1977）把转化作为实验终点，将检测悬浮细胞的克隆形成能力（参见22.4.1节）作为转化作用的标准。但对这些系统持批评意见的人认为，这些系统的靶标是已经部分转化的细胞，甚至被某些人采用的BHK21-C13细胞也是一个连续细胞系，因此不能看作完全正常的细胞。此外，多数常见肿瘤均起源于上皮组织而非结缔组织的细胞。

在某些情况下，癌基因表达或扩增能力的增强，或者癌基因产物的增加或变化，都可作为功能上与致癌作用相关的可靠标准。采用微阵列分析已使之成为可能。同样，抑癌基因的缺失或突变也可进行分子水平的分析，在恶性转化事件中，*p53*、*Rb*、*p16*和*L-CAM*（E-钙黏蛋白）基因的缺失或突变占大多数。目前认为在致癌性测试中，可以应用表达分析来替代致突变作用（Nuwaysir et al.，1999；Desai et al.，2002；Vondracek et al.，2002）。

24.6 炎症反应

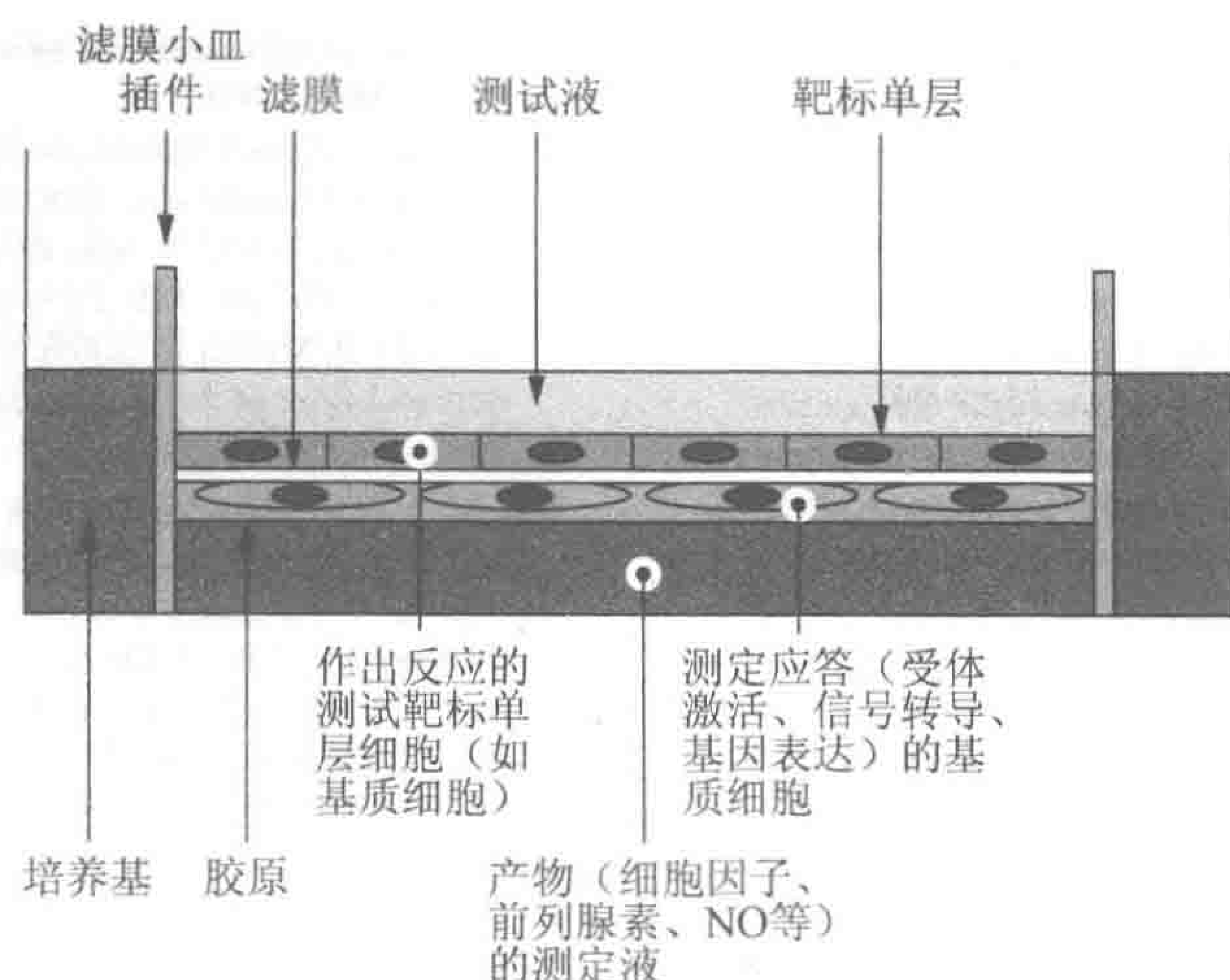
现在越来越需要用组织培养实验揭示炎症反应，这些反应可能是由局部应用的药物和化妆品所引起，或是由吸入或摄入异源生物体所导致，它们是造成多种形式过敏反应的原因。虽然这一领域只是处于早期发展阶段，但其前景很好，是很多领域中的敏感话题。动物权力保护组织对无谓应用大量动物检测新的化妆品感到愤慨，因为其除了给制造商带来商业利益外别无益处，尤其是用Draze实验对物质（如洗发水）进行检测尤甚，因为Draze实验要将化合物加到兔子的眼睛中。更为重要的是，临床上由药物和异源生物引起的过敏反应显著增多，人们对这些反应知之甚少且很难控制它们，主要原因还是缺乏简单易行且可以重复的体外实验。

自滤膜皿技术出现以后，利用滤膜皿系统提供的不同细胞类型共培养，建立了几种皮肤（例如，见彩版20）和角膜模型（Braa and Triglia，1991；Triglia et al.，1991；Fusenig，1994；Roguet et al.，1994；Kondo et al.，1997；Brinch and Elvig，2001；Cantòn et al.，2010）。这些系统假定一种过敏原或刺激物与初级靶标（如表皮）间的相互作用启动了旁分泌反应，从而促发了次级基质成分（如真皮）释放细胞因子（图24.10）。可以用ELISA技术检测这些细胞因子，从而监控反应的程度。尽管这一技术仍处于早期发展阶段，但市场已有售试剂盒用于测定各种刺激反应，如Epiderm（MatTek）（Koschier et al.，1997）、Episkin（Saduc）（Cohen et al.，1997）、SkinEthic（Brinch and Elvig，2001）；综述（Schäfer-Korting et al.，2008）（另见彩版21）。第25章提供了适于模拟刺激反应的表皮、口腔和角膜培养方案（参见方案25.1-Su、方案25.2-Su、方案25.10-Su）。


彩版20


彩版21

这一系统是目前主要的发展领域，它使得从患者自身的皮肤中筛选过敏原成为可能。从胃肠道进行培养分析可以揭示肠易激综合征的主要过敏原，从气管支气管细胞进行器官型培养分析可以确定与患者相关的哮喘病因。在这些及许多其他情况下，都有可能对异常的细胞间相互反应的机制进行特异性研究，而这种相互反应正是许多过敏和退行性疾病的典型特征。




彩版20

图24.10 器官型实验。这是一种设想的检测系统，将一种细胞层（如表皮角质形成细胞）与另一种相关类型的细胞（如胶原中的皮肤成纤维细胞，见彩版20）共培养，并将其暴露于一种刺激物中，然后通过细胞因子的释放来测定其反应（参见彩版21）


彩版21

参考文献

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**:43–47.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwiniski MJ, Fine DL, Abbot BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**:589–601.

Ames BN (1980). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**:587–593.

Babich H, Borenfreund E (1990). Neutral red uptake. In DoyleA, GriffithsJ.B, NewallDG (eds.), *Cell and tissue culture: Laboratory procedures*. Chichester, UK: Wiley, Module 4B:7.

Bateman AE, Peckham MJ, Steel GG (1979). Assays of drug sensitivity for cells from human tumours: *In vitro* and *in vivo* tests on a xenografted tumour. *Br. J. Cancer* **40**:81–88.

Berky JJ, Sherrod PC (eds.) (1977). *Short term in vitro testing for carcinogenesis, mutagenesis and toxicity*. Philadelphia: Franklin Institute Press.

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1990). Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26**:1030–1034.

Boyd MR (1989). Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles Pract. Oncol.* **10**:1–12.

Braa SS, Triglia D (1991). Predicting ocular irritation using three-dimensional human fibroblast cultures. *Cosmet. Toilet.* **106**:55–58.

Brinch DS, Elvig SG (2001). Evaluation of an in vitro human corneal model as alternative to the in vivo eye irritation testing of enzymes. *Toxicol. Lett.* **123**(Suppl. 1):22.

Cantòn ID, Cole DM, Kemp EH, Watson PF, Chunthapong J, Ryan AJ, MacNeil S, Haycock JW (2010). Development of a 3D human in vitro skin co-culture model for detecting irritants in real-time. *Biotechnol. Bioeng.* **106**:794–803.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987a). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**:936–942.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987b). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* **47**:943–946.

Chou TC (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**:621–681.

Cohen C, Roguet R, Cottin M, Olive C, Leclaire J, Rougier A (1997). The use of Episkin, a reconstructed epidermis, in the evaluation of the protective effect of sunscreens against chemical lipoperoxidation induced by UVA. *J. Invest. Dermatol.* **108**:77.

Cole J, Fox M, Garner RC, McGregor DB, Thacker J (1990). Gene mutation assays in cultured mammalian cells. In KirklandDJ (ed.), *Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures, Part 1 (revised)*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, pp. 87–114.

Cole SPC (1986). Rapid chemosensitivity testing of human lung tumour cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17**:259–263.

Cox P, Chrisochoidis M (2003). *Directive 2003/15/EC of the Eurtopean Parliament and of the Council* (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l_066/l_06620030311en00260035.pdf).

Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J (1994). Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol.* **41**:15–38.

Desai KV, Kavanaugh CJ, Calvo A, Green JE (2002). Chipping away at breast cancer: insights from microarray studies of human and mouse mammary cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* **9**:207–220.

EURL-ECVAM (2015). The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM). (https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/).

Freshney RI (1978). Use of tissue culture in predictive testing of drug sensitivity. *Cancer Top.* **1**:5–7.

Freshney RI, Morgan D (1978). Radioisotopic quantitation in microtitration plates by an autofluorographic method. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**:275–380

Freshney RI, Celik F, Morgan D (1982). Analysis of cytotoxic and cytostatic effects. In DavisW, MalvoniC, TannebergerS (eds.), *The control of tumor growth and its biological base*. Vol. 10, *Fortschritte in der Onkologie* (*Research in Oncology*). Berlin: Akademie-Verlag, pp. 349–358.

Freshney RI, Paul J, Kane IM (1975). Assay of anticancer drugs in tissue culture: Conditions affecting their ability to incorporate H-leucine after drug treatment. *Br. J. Cancer* **31**:89–99.

Fusenig NE (1994). Cell culture models: reliable tools in pharmacotoxicology? In FusenigNE, GrafH (eds.), *Cell culture in pharmaceutical research*. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1–7.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* **16**(8):1093–1107.

Grafström RC (1990a). *In vitro* studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. *Mutat. Res.* **238**:175–184.

Grafström RC (1990b). Carcinogenesis studies in human epithelial tissues and cells *in vitro*: Emphasis on serum-free culture conditions and transformation studies. *Acta Physiol. Scand.* **140**:93–133.

Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C (2008). Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**:1279–1294.

Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**:461–463.

Hartung T, Daston G (2009). Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol. Sci.* **111**:233–237.

Hathaway WE, Newby LA, Githens JH (1964). The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. I. Correlation with Trypan Blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. *Blood* **23**:517–525.

Hill BT (1983). An overview of clonogenic assays for human tumour biopsies. In DendyPP, HillBT (eds.), *Human tumour drug sensitivity testing in vitro*. New York: Academic Press, pp. 91–102.

Jones RJ, Matsui WH, Smith BD (2004). Cancer stem cells: are we missing the target? *J. Natl. Cancer Inst.* **96**:583–585.

Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* **15**:112–117.

Kendig DM, Tarloff JB (2006). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies. *Toxicol. In Vitro* **21**(1):125–132.

Khetani SR, Bhatia SN (2008). Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* **26**:120–126.

Knight DJ, Breheny D (2002). Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *Altern. Lab. Anim.* **30**:7–22.

Kondo S, Kooshesh F, Sauder DN (1997). Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *J. Cell. Physiol.* **171**:190–195.

Koschier FJ, Roth RN, Wallace KA, Curren RD, Harbell JW (1997). A comparison of three-dimensional human skin models to evaluate the dermal irritation of selected petroleum products. *In Vitro Toxicol.* **10**:391–405.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**:3–11.

Latt SA (1974). Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3395–3399.

Lübberstedt M1, Müller-Vieira U, Biemel KM, Darnell M, Hoffmann SA, Knöspel F, Wönne EC, Knobeloch D, Nüssler AK, Gerlach JC, Andersson TB, Zeilinger K (2012). Serum-free culture of primary human hepatocytes in a miniaturized hollow-fibre membrane bioreactor for pharmacological in vitro studies. *J Tissue Eng. Regen. Med.* (doi: 10.1002/term.1652).

Macé K, Gonzalez FJ, McConnell IR, Garner RC, Avanti O, Harris CC, Pfeifer AMA (1994). Activation of promutagens in a human bronchial epithelial cell line stably expressing human cytochrome P450 1A2. *Mol. Carcinogen.* **11**:65–73.

McGregor DB, Edwards I, Riach CJ, Cattenach P, Martin R, Mitchell A, Caspary WJ (1988). Studies of an S9 based metabolic activation system used in the mouse lymphoma L51768Y cell mutation assay. *Mutagenesis* **3**:485–490.

Morgan D, Freshney RI, Darling JL, Thomas DGT, Celik F (1983). Assay of anticancer drugs in tissue culture: Cell cultures of biopsies from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **47**:205–214.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55–63.

Nilsson J-A, Zheng X, Sundqvist K, Liu Y, Atzori L, Elfwing Å, Arvidson K, Grafström RC (1998). Toxicity of formaldehyde to human oral fibroblasts and epithelial cells: Influences of culture conditions and role of thiol status. *J. Dental Res.* **77**:1896–1903.

Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA (1999). Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.* **24**:153–159.

Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* **49**:4435–4440.

Roguet R, Cohen C, Rougier A (1994). A reconstituted human epidermis to assess cutaneous irritation, photoirritation and photoprotection *in vitro*. *In Vitro Skin Toxicol.* **10**:141–149.

Rotman B, Papermaster BW (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**:134–141.

Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, Düsing HJ, Gamer A, Haltner-Ukomadu E, Hoffmann C, Kaca M, Kamp H, Kersen S, Kietzmann M, Korting HC, Krächter HU, Lehr CM, Liebsch M, Mehling A, Müller-Goymann C, Netzlaff F, Niedorf F, Rübbelke MK, Schäfer U, Schmidt E, Schreiber S, Spielmann H, Vuia A, Weimer M (2008). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Altern. Lab. Anim.* **36**:161–187.

Schrek T (1958). Slide-chamber method to measure sensitivity of cells to toxic agents. *AMA* (Am. Med. Asssoc.) *Arch. Pathol.* **6**:569.

Styles JA (1977). A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture. *Br. J. Cancer* **36**:558.

Thomas DGT, Darling JL, Paul EA, Mott TC, Godlee JN, Tobias JS, Capra LG, Collins CD, Mooney C, Bozek T, Finn GP, Arigbabu SO, Bullard DE, Shannon N, Freshney RI (1985). Assay of anticancer drugs in tissue culture: Relationship of relapse free interval (FRI) and *in vitro* chemosensitivity in patients with malignant

cerebral glioma. *Br. J. Cancer* **51**:525–532.

Triglia D, Braa SS, Yonan C, Naughton GK (1991). Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol. In Vitro* **5**:573–578.

Tweats DJ, Scott AD, Westmoreland C, Carmichael PL (2007). Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity in vitro–challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive. *Mutagenesis* **22**:5−13.

Vanparys P (2002). ECVAM and pharmaceuticals. *Altern. Lab. Anim.* **30**(Suppl. 2):221–223.

Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**:2515–2520.

Von Hoff DD, Clark GM, Weis GR, Marshall MH, Buchok JB, Knight WA, Lemaistre CF (1986). Use of *in vitro* dose response effects to select antineoplastics for high dose or regional administration regimens. *J. Clin. Oncol.* **4**:18–27.

Vondracek M, Weaver D, Sarang Z, Hedberg JJ, Willey J, Wärngård L, Grafström RC (2002). Transcript profiling of enzymes involved in detoxification of xenobiotics and reactive oxygen in human normal and Simian virus 40 T antigen-immortalized oral keratinocytes. *Int. J. Cancer* **99**: 776–782.

Zhu SY, Cunningham ML, Gray TE, Nettesheim P (1991). Cytotoxicity, genotoxicity and transforming activity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rat trachea epithelial cells. *Mutat. Res.* **261**(4):249–259.

（向若兰 杨燕丽 译）

第 25 章

特殊类型细胞的培养


彩版 27


彩版 28

人们对于特殊类型细胞在研究特殊的发育过程及其病理机制、细胞疗法或特殊类型细胞筛选方面应用的兴趣与日俱增。由此，现在可从公司购买许多类型的人和鼠的特殊类型细胞（表 25.1A、B）。这些细胞常列为“原代细胞”，是指从原代培养获得。然而，也并不总是原代细胞，因为有的公司出售的细胞已传代过，在技术上已成为细胞系（不用“原代细胞系”，该术语不正确，见 2.7 节）。将这些早期传代的细胞系称为特殊细胞或特殊细胞系是基于细胞自然性或适当诱导后表达特殊细胞的特征（彩版 27、彩版 28）。

表 25.1A　特殊细胞的类型和供应公司

组织	细胞类型	供应公司*
主动脉	内皮细胞	ATCC；Lonza
	平滑肌细胞	ATCC
血液	干细胞	Promocell
膀胱	微血管内皮细胞	Lonza
骨	成骨细胞	Cell Applications；ECACC；Promocell；TCS Cellworks
骨髓	间质细胞	Cell Applications；ECACC
	造血干细胞	Befutur；ReachBio
	间充质干细胞	Befutur；Cell Applications；ECACC；Promocell；TCS Cellworks
脑	神经干细胞	Befutur；Neuromics
	大鼠、小鼠和人神经细胞	Invitrogen；Millpore；Neuromics；TCS Cellworks
	大鼠、小鼠和人星形胶质细胞	Lonza；Millpore；Neuromics；TCS Cellworks
乳腺	上皮细胞	Cell Applications；ECACC；Invitrogen；Lonza
软骨	软骨细胞	Cell Applications；ECACC；Cell Genix；Promocell；TCS Cellworks
角膜	上皮细胞	Invitrogen；Millpore；TCS Cellworks
	角膜细胞	TCS Cellworks
	上皮滤膜培养板构件	SkinEthic
食管	上皮细胞	TCS Cellworks
脂肪	前脂肪细胞	BioPredic；Cell Applications；ECACC；Promocell；ReachBio；Zen Biologicals
	间充质干细胞	Promocell；Zen Biologicals
心脏	心肌细胞	Promocell；ReachBio
	冠状动脉内皮细胞；微血管内皮细胞	Lonza

续表

组织	细胞类型	供应公司*
人胚胎	人、小鼠胚胎干细胞	Befutur；Millipore
	神经干细胞	Millipore
肾	上皮细胞	ATCC；Lonza；TCS Cellworks
肝	肝细胞	Invitrogen；Lonza Biologicals；Promocell；ReachBio；TCS Cellworks；Zen Biologicals
	肝血窦内皮细胞	TCS Cellworks
肺	上皮细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza；TCS Cellworks
	成纤维细胞	Cell Applications；ECACC；TCS Cellworks
	内皮细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza
	平滑肌成肌细胞	Lonza
淋巴管	内皮细胞	Lonza
小鼠胚胎	成纤维细胞	Millipore
	胚胎干细胞	Thermo Fisher
口腔	角质形成细胞	TCS Cellworks
	牙龈上皮细胞	Millipore
腹膜	前脂肪细胞	Zen Biologicals
	间皮细胞	Zen Biologicals
胎盘	上皮细胞	Cell Applications；ECACC
前列腺	上皮细胞	ATCC；Lonza
	成纤维细胞	Lonza
	平滑肌成肌细胞	Lonza
骨骼肌	骨骼肌成肌细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza；Promocell；ReachBio；TCS Cellworks；Zen Biologicals
皮肤	角质形成细胞	ATCC；BioPredic；Cell Applications；ECACC；Invitrogen；Lonza；Millipore；Promocell；TCS Cellworks；Zen Biologicals
	成纤维细胞	ATCC；BioPredic；Cell Applications；ECACC；Lonza；Promocell；Zen Biologicals
	内皮细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza
	前脂肪细胞	Zen Biologicals
	黑素细胞	ATCC；BioPredic；Cell Applications；ECACC；Invitrogen；Lonza；Promocell；TCS Cellworks
滑膜	滑膜细胞	Cell Applications；ECACC
睾丸	支持细胞	Lonza
气管	上皮细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza
脐带	内皮细胞	ATCC；Cell Applications；ECACC；Lonza；Millipore
	平滑肌成肌细胞	Cell Applications；ECACC；Lonza
	间充质干细胞	Promocell
血管	内皮细胞	ATCC；BioPredic；Cell Applications；ECACC；Invitrogen；Lonza；Promocell
	平滑肌成肌细胞	ATCC；Invitrogen；Lonza；Promocell；TCS Cellworks
	成纤维细胞	Invitrogen；TCS Cellworks

* 每种细胞的供应公司也可见补充材料中的附录Ⅲ，公司网址见补充材料中的附录Ⅳ，可扫描封底二维码获取。

表 25.1B 供应特殊细胞的公司

公司	细胞类型	URL
ATCC	多种细胞	www.atcc.org www.lagcstandards-atcc.org/Products/Cell-and-Microorganisms/Human-Primary-Cells.aspx?geo-country=gb
Befutur	表皮、角膜、牙龈上皮细胞	www.befutur.com/html/03-technology/03b-cells.php
BioPredic	表皮细胞、肝细胞	www.biopredic.com/page0001007f.html#1000065c1
Cell Applications	多种细胞	www.cellapplications.com/primary-cells
Cell Genix	脐带间充质干细胞	www.cellgenix.com/products/product-lines/cellgror-supplements-cells/cellgror-huc-msc.html
Cook Myosite	骨骼肌细胞	www.cookmyosite.com/researchProducts.php?utm-source=google&utm-medium=cpc&utm-content=Original&utm-campaign=Primary%20Cell&utm-term=Primary%20Human%20Cells
ECACC	多种细胞	www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/primarycells/index.aspx
Life Technologies	多种细胞	www.lifetechnologies.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/primary-cell-culture.html?s-kwcid=AL!3652!3!31189792970!b!!g!!human%20primary%20cells&ef-id=UisJkgAABZVD9QQ0:20141114085324:s
Lonza	多种细胞	http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells.aspx
Merck Millipore	多种细胞	www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/cell-culture-systems/stem-cell-
EMD Millipore		research/j8Ob.qB.YRoAAAE-JVARHeN6,nav
Neuromics	神经细胞、干细胞	www.neuromics.com/a-to-z
Promocell	多种细胞	www.promocell.com/products/?gclid=C17mv9Ld-cECFauWtAodohAAPA
ReachBio	多种细胞	http://reachbio.com/products/primary-human-cells/
SkinEthic	表皮	www.episkin.com/
TCS Cellworks	血管新生细胞	www.cellworks.co.uk/
Zen Biologicals	多种细胞	www.zen-bio.com/products/cells/index.php

对于希望培养特殊细胞的任何人来说，问题总是在于是自己分离和分选细胞还是从公司购买细胞。不同类型的特殊细胞（如表皮角质形成细胞、黑素细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、真皮成纤维细胞、乳腺上皮细胞等）可从公司购买（参见表 25.1A、B 和补充材料中的附录III）。皮肤培养物可从 Epiderm（MatTek）和 Episkin（SkinEthic）购买，用于细胞毒性和炎性反应的研究。这些皮肤培养物是在装有滤膜的培养皿中制备的，称为“皮肤等同物”，即在铺有胶原蛋白尼龙网上共培养角质形成细胞和真皮成纤维细胞（参见 25.4.1 节）。有人也用类似的方法制备了其他组织，特别是角膜（SkinEthic），用于细胞毒性研究（参见方案 25.2-Su 和彩版 21）。



彩版21

上述细胞的价格昂贵，一安瓿冷冻细胞的价格为$500~$1000。但是，需将自己建立基本技术、时间与委托他人的花费相比较。在需要使用特殊患者或特殊疾病的组织、特殊遗传特征或不同种系的组织情况下，最好自己分离和培养细胞。另外，已正在培养特殊细胞和使用选择性培养液的

实验室不需要太多花费即可扩展培养另一种细胞。于是，本章提供了许多方案，以便使读者评价细胞培养的复杂性和花费，从而选择是自己培养细胞还是购买。对每种细胞提供了一家或多家供应公司（参见表 25.1A、B 和补充材料中的附录III：特殊细胞，公共机构或个人提供的细胞类型）。

特殊细胞培养可通过 3 条途径实现：①分离已分化的细胞或组织，此用于短期非再生性培养（参见 25.2 节）；②分离前体细胞，在选择性培养条件下扩增培养（参见下述和 9.2 节、16.6 节），然后诱导分化（参见 19.7 节）；③分离干细胞，建立获得干细胞群或可向一种或几种细胞表型分化的培养（参见第 26 章）。不同特殊细胞培养的技术也不同。本章将介绍一些特殊组织的细胞培养技术。

25.1 特殊细胞培养技术

已有许多有关特殊类型细胞培养的综述（Doyle et al.，1990~1999；Pollard and Walker，1990；Freshney et al.，1994；Leigh and Watt，1994；Freshney and Freshney，1996，2002；Ravid and Freshney，1998；Haynes，1999；Federoff and Richardson，2001；Wise，2002；Vunjak-Novakovic，2006）（另见表 2.1）。

细胞系永生技术的发展（Freshney and Freshney，1996）（另见 22.3 节和短篇综述 22.1）表明，可以由非转化组织的有限细胞系建立连续细胞系（Chang et al.，1982；Freshney et al.，1994；Klein et al.，1990；Steele et al.，1992；Wyllie et al.，1992）。在许多情况下，细胞系丧失分化特性。但是，用可控性启动子（如温度敏感性启动子）可恢复分化表型。尽管培养的转基因鼠细胞已是永生的，但是仍保留部分分化功能，故携带 *SV40LT* 基因的转基因鼠模型的建立为恢复分化表型的可能性开辟了广阔前景（Jat et al.，1991；Yanai et al.，1991；Morgan et al.，1994；Whitehead and Robinson，2009）。由于这些细胞携带永生基因的温度敏感性启动子，在非允许温度（37℃）条件下可能恢复正常表型。

本章特殊类型细胞的实验方案在补充材料中叙述，根据细胞类型和来源的胚层（参见 2.7 节）分类，按上皮细胞（25.2 节；大多数来源于外胚层和内胚层，少数来源于中胚层如肾小管的上皮细胞）、间充质细胞（来源于中胚层；25.3 节）、神经外胚层来源的细胞（如神经元、神经胶质细胞和黑素细胞；25.4 节）和造血细胞（来源于中胚层；25.5 节）排列。干细胞培养在第 26 章叙述。

估计细胞培养实验室的基本需要条件（参见第 3、4 章）可用于本章的实验方案，故层流超净工作台、倒置显微镜、台式离心机和水浴箱将不再在材料中列出。

25.2 上 皮 细 胞

上皮细胞与许多器官的已知功能有关，如肾和肠的物质定向运输、胰的消化酶分泌、肝的物质代谢、肺的气体交换和皮肤的屏障保护。上皮细胞有利于建立细胞分化和干细胞动力学模型，如表皮角质形成细胞（Watt，2001，2002），且上皮是常见肿瘤发生的主要组织。上皮细胞纯化培养的主要问题是结缔组织的成纤维细胞和血管内皮细胞等间质细胞的过度生长。大多数培养技术改进的目的在于通过调整培养液的营养成分或改变培养底物（表 25.2）预防这些细胞的过度生长，这些培养条件可促进未分化的表皮生长并有利于干细胞生长。尽管后来的改进常不顾及细胞增殖，但可用于促进表皮细胞分化（参见 19.3 节，图 2.7）。

表 25.2 成纤维细胞过度生长的抑制

方法	材料	组织	参考文献
选择性分离	胰蛋白酶	胎肠、心肌、表皮	Owens et al.，1974；Milo et al.，1980
	胶原蛋白酶	乳腺癌	Freshney，1972；Lasfargues，1973
饲养层	鼠 3T3 饲养细胞	表皮	Rheinwald and Green，1975
	胎儿肠饲养细胞	正常和肿瘤乳腺上皮	Stampfer et al.，1980
		结肠癌	Freshney et al.，1982
选择性抑制剂	D-缬氨酸	肾上皮	Gilbert and Migeon，1975，1977
	cis-OH-脯氨酸	细胞系	Kao and Prockop，1977
	乙基汞硫水杨酸盐	新生儿胰腺	Braaten et al.，1974
	苯巴比妥	肝	Fry and Bridges，1979
	中胚层抗体	鳞癌	Edwards et al.，1980
		结肠腺瘤	Paraskeva et al.，1985
	遗传霉素	黑素细胞、黑色素瘤	Levin et al.，1995
选择性培养液	MCDB 153	表皮	Boyce and Ham，1983
（参见 9.2.1 节）	MCDB 170	乳腺	Hammond et al.，1984
	低钙培养液	表皮黑素细胞	Naeyaert et al.，1991

血清中的生长因子多来源于血小板，对于成纤维细胞有较强的促有丝分裂作用，并可通过诱导终末分化抑制上皮细胞的增殖。因此，分离和扩增特殊细胞的最重要的事情之一是发明添加特异性生长因子（参见表 9.4）的选择性无血清培养液（参见表 25.1A、B 和 9.2 节）。

最好在 4℃条件下用胶原蛋白酶（参见方案 11.9）、中性蛋白酶或胰蛋白酶从供体组织分离上皮细胞，该技术可分散基质细胞，但需保留上皮细胞呈小簇状，以便于上皮细胞的分离，这样有利于细胞存活。

25.2.1 表皮


彩版 11

由于表皮模型在组织学方面显示不同发育状态的细胞，并且是最早借助于3T3细胞饲养层支持生长（彩版11a）的模型之一，故表皮模型是研究上皮分化的最有兴趣模型。人们曾试图将培养的表皮角质形成细胞用作分化模型、理想的器官型培养组织的构建细胞（彩版20）和细胞间相互作用的研究（Maas-Szabowski et al.，2002）及烧伤或外伤修复的移植细胞（Coolen et al.，2007）。角质形成细胞可从许多公司购买到（表25.1A、B 和彩版27a）。


彩版 20

由于细胞培养基本技术的进展和人们对于各种上皮组织培养必要条件的掌握，现在通过细胞培养技术能够培养和研究大部分复层上皮的角质形成细胞。皮肤的鳞状上皮及其分离的角质形成细胞已主要用于体外生理学和病理学研究。此外，已在各种条件下分离和培养了口腔黏膜细胞（Tomakidi et al.，1997；Grafström，2002）和皮肤附属器细胞如毛囊（参见综述，Fusenig et al.，1994a，1994b），并已通过细胞培养和移植构建了组织（Limat et al.，1995；Maas-Szabowski et al.，2000，2002）。


彩版 27

各种组织和器官的原代或早期传代细胞可以从多家公司购买到（表25.1A、B，补充材料中的附录III和彩版27a），以便于利用正常细胞进行各项研究，如比较癌细胞的功能特征。商家提供的早期传代的角质形成细胞常来源于新生儿的包皮，常常不能区别外层的正常角化的细胞和内层的

黏膜型细胞，由此限制了与成年皮肤来源的角质形成细胞的比较。另外，对于特殊研究目的尤其是涉及银屑病和恶性肿瘤等病变皮肤的角质形成细胞，需要用特定的成人皮肤标本进行分离和培养。

下面关于表皮角质形成细胞培养的引言和方案部分是由 Fusenig NE 和 Stark HJ 提供的；方案 25.1-Su 见本章的补充材料。

25.2.2 角膜

人们一直试图用培养的角膜上皮（参见 24.6 节，彩版 21）取代兔眼实验（Draize 实验），故对于培养形成角膜产生了很大兴趣（Dart，2003）。角膜构建物可从 SkinEthic 公司购买到。人们试图制备工程化角膜用于移植（Wu et al.，2014）。


彩版21

关于人角膜培养的方案 25.2-Su 见本章的补充材料。

体外扩增的人角膜上皮细胞为探讨毒理学现象和基本的细胞生物学机制提供了合适的研究模型。尽管原代细胞适合于体外研究，但较长寿命的人角膜上皮细胞系是各实验室共用的可靠来源之一。

另外，可从角膜分离培养角膜缘细胞、基质细胞和内皮干细胞（Du and Funderburgh，2007）。角膜缘干细胞在气液界面条件下可分化为复层细胞。

25.2.3 乳腺

乳汁（Buehring，1972；Ceriani et al.，1979）和乳房复位成形术切除组织（Stampfer et al.，2002；Laberge et al.，2007）是正常乳腺导管上皮的合适材料来源。从乳汁能得到较纯的上皮细胞，但细胞存活时间较短。最好用胶原蛋白酶（Speirs et al.，1996）进行初步消化分离，并在胎儿小肠饲养层上培养细胞（Stampfer et al.，1980；Freshney et al.，1982b），可抑制正常组织和癌组织的基质细胞污染（彩版 6c、d，彩版 15b）。优化使用最适宜的培养液（Stampfer et al.，1980；Smith et al.，1981；Hammond et al.，1984）能对上皮细胞进行连续传代和克隆培养。胶原蛋白凝胶培养法有利于构建类似于供体组织的三维结构（Berdichevsky et al.，1992；Gomm et al.，1997），用 Matrigel 培养可构建含有干细胞和已分化的腺上皮的终末导管小叶单位（termial ductal lobular unit，TDLU）（LaBarge et al.，2007）（见方案 25.3-Su 和彩版 26e）。如同表皮细胞，霍乱毒素（Taylor-Papadimitriou et al.，1980）和 EGF（Osborne et al.，1980）刺激正常乳腺上皮细胞的体外生长。关于激素的叙述很复杂。许多上皮细胞在添加 1~10IU/mL 胰岛素和约 10nmol/L 氢化可的松的培养液内容易存活。器官培养时，乳腺上皮的分化需要使用氢化可的松、胰岛素、催乳素（Darcy et al.，1995），也需要雌激素、孕激素和生长激素（Klevjer-Anderson and Buehring，1980）。可从多家公司购买到乳腺上皮细胞（见表 25.1A、B；补充材料中的附录III、彩版 27c）。


彩版6


彩版15


彩版26


彩版27

方案 25.3-Su 是从乳房复位成形术切除组织培养乳腺上皮细胞，见本章的补充材料和图 25.1。

25.2.4 子宫颈

使用表皮角质形成细胞培养（Rheinwald and Green，1975）的改进方法（Stanley and Parkinson，1979）可以按克隆密度系列培养子宫颈的角质形成细胞。

图 25.1　从乳腺分离类器官结构。（a）胶原蛋白酶消化后通过选择性沉降和离心分离不同组分的流程图。（b）由 Muc⁻/ESA⁺/CD29hi D920 细胞形成的 TDLU 样结构（LaBarge et al.，2007）。细胞种植在 I 型胶原蛋白和层粘连蛋白-1 三维凝胶上。这些结构表达角质素-14（红色）和角质素-8（绿色；共聚焦显微镜图像）。该图像是由几幅图像经三维重建而成。*示管腔，标尺＝50μm。此图是根据 Labarge 等（2007）的图改制的，又见彩版 26e


彩版26

子宫颈上皮细胞培养方案 25.4-Su 见本章的补充材料。

在方案 25.4-Su 叙述的子宫颈上皮角质形成细胞的培养方法可广泛用于乳头状瘤的发生和细胞分化，以及细胞对于诱变物质和致癌物质的反应等方面的研究。

25.2.5　胃肠道

尽管人结肠癌的连续细胞系已有许多报道（参见 25.16.4 节），但正常肠上皮培养的报道较少。Owens 等（1974）能够从胎儿肠上皮分离细胞，建立有限细胞系（FHS 74 Int）。鼠肠上皮细胞系 IEC-6 得到了广泛应用（Rak et al.，1995；Bedrin et al.，1997）。另外，在 Wnt 信号依赖性干细胞微环境条件下分离出肠上皮（Ootani et al.，2009）。

结肠隐窝上皮细胞培养方案 25.5-Su 见本章的补充材料。

25.2.6　肝

尽管自成人肝分离的细胞不表达肝实质的全部特性，但无疑能够分离不同类型的细胞和培养

确切的细胞系。由于人们的主要兴趣集中于肝细胞培养，大多数研究聚焦于培养条件，以便改善肝细胞在体外的存活和功能，其中包括与肝的其他细胞的相互作用（Corlu et al.，1997）。由此，可在合适条件下培养从肝组织分离的功能性肝细胞（Guguen-Guillouzo，2002）。

肝细胞分离方案 25.6-Su 见本章的补充材料。

迄今为止，尽管能够培养来自多种动物的原代肝细胞（参见表 25.1A、B，补充材料中的附录III），但建立持续增殖的肝细胞系（主要是人肝来源）的愿望尚未完全实现。然而，一些分化的细胞系建立已有报道，如 Hep-G2（Knowles et al.，1980），并且近来在新的人肝癌细胞系 HepaRG 建立方面取得了很大进展。HepaRG 具有肝细胞分化功能，故可代替原代人肝细胞（参见 25.2.7 节）。

25.2.7 人肝细胞系 HepaRG

本小节由 Guguen-Guillouzo C（Université Rennesl，INSERM U522，Hôpital de Pontchaillou，Rue Henri le Guilloux，35033 Rennes，France）提供。

体外培养模型中，原代人肝细胞对于研究肝细胞功能最合适。然而，人肝细胞的不可预见性、缺乏利用性和供体标本的差异性限制了其应用。有人提出，可用人肝细胞系替代。用于建立表现特殊功能的肝细胞系有两种策略。人们曾致力于成年肝细胞的致瘤性永生研究，但结果很令人失望。最强的永生细胞系可能是来源于人肝细胞（转染 *SV40LT* 抗原基因）的 Fa2N-4 细胞系（Mills et al.，2004）。实际上，最常用的人肝细胞系来源于肝肿瘤，如 Hep-G2、Hep3B、PLC/PRFs HUH7、HBG。Hep-G2 细胞系的应用很有效（Knowles et al.，1980），但细胞逐渐失去了正常肝的大多数代谢特性。Kelly 和 Sussman（2000）建立了表达较高药物代谢特性的亚克隆细胞系 Hep-G2/C3A。HBG 是一种高分化肝癌细胞系，但因生长缓慢而在某种程度上限制了其应用（Glaise et al.，1998）。HUH7 细胞系保留了肝的数种特殊功能，常用于病毒性肝炎的研究（Lohmann et al.，1999）。

只是近来才获得了保留肝特异性浆蛋白和糖酵解酶表达的 HepaRG 细胞系，该系也可诱导和高表达 I 期及 II 期解毒酶（Aninat et al.，2006）。HepaRG 细胞系来源于一位女性肝癌患者，具有同源性细胞特征，仅核型稍改变。生长达到单层时这些细胞呈现肝细胞分化全部程序的特征（Gripon et al.，2002）。该细胞系的不足之处在于转分化特性，解除单层状态时细胞在几小时内转为去分化的双向潜能肝祖细胞。开始细胞分裂活跃，达到单层时向肝细胞或胆管细胞分化，在 2% DMSO 条件下两周内产生混合细胞群，约 50%细胞为肝细胞（图 25.2a）。

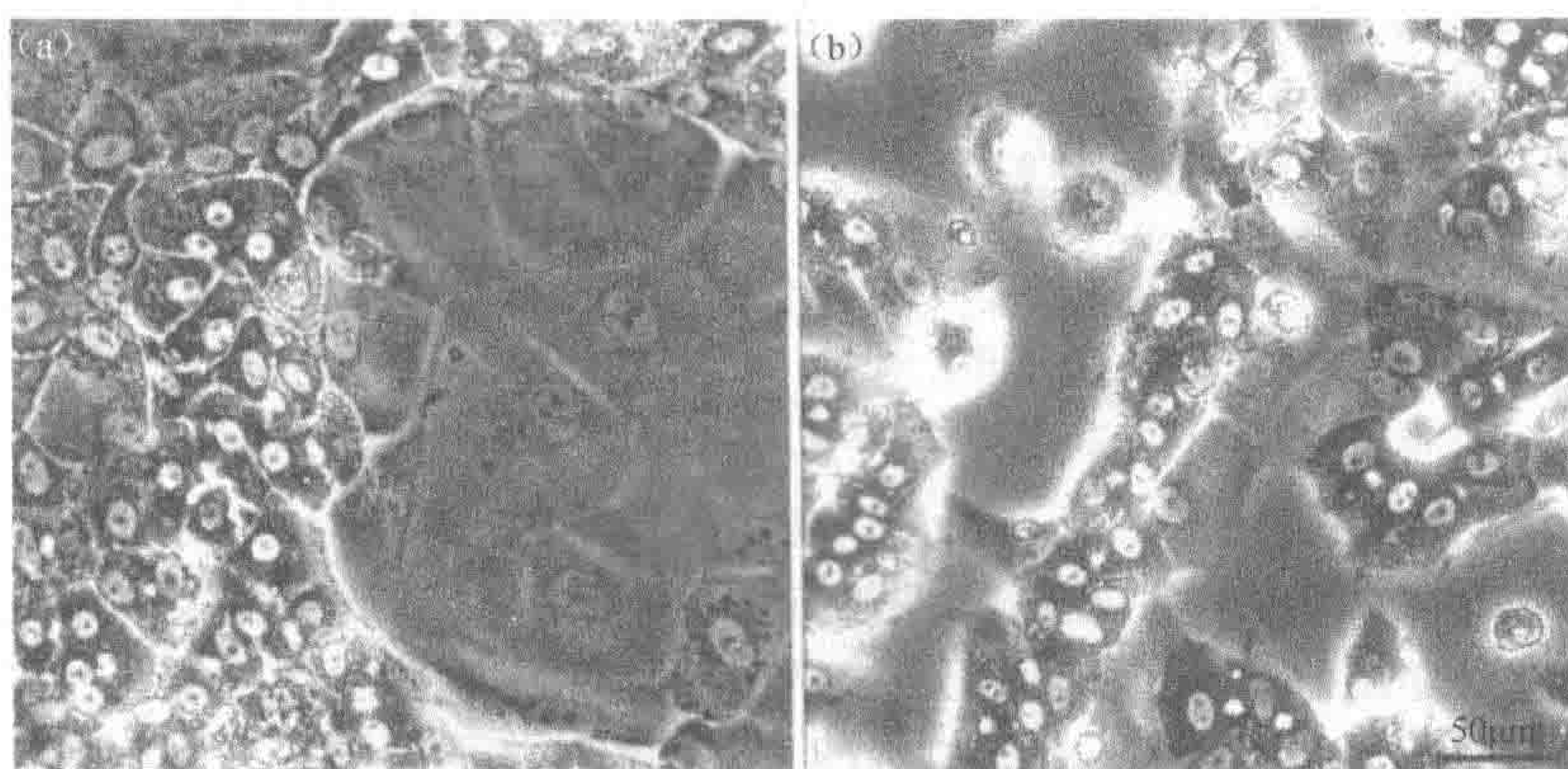


图 25.2 HepaRG 细胞。HepaRG 活细胞的相差显微镜照片。（a）培养后 4 周的分化细胞，曾用 2% DMSO 维持培养 2 周。注意高分化的肝细胞克隆被扁平的胆管细胞围绕；（b）培养后两天的已分离过的肝细胞，用 2% DMSO 维持培养。注意在典型的肝细胞柱上的肝细胞纯度和肝细胞构筑

纯化人肝细胞系 HepaRG 的方案 25.7-Su 见本章的补充材料。

25.2.8 胰

已能够培养从胰腺组织分离的腺泡细胞（Bosco et al.，1994）和胰岛细胞（Vonen et al.，1992；Cao et al.，1997）。胶原蛋白酶和热解素（Roche；Serva）是分离胰岛细胞的合适分散剂（Anazawa et al.，2009）。已从“永生鼠”建立了细胞系（Blouin et al.，1997）。目前，腺瘤向癌转化引起了人们的特别兴趣（Perl et al.，1998）。

胰上皮细胞培养方案 25.8-Su 见本章的补充材料。

25.2.9 气管和支气管上皮


彩版 27

对于其他来源的上皮细胞，现在可从多家公司购买到早期传代的气管和支气管上皮细胞（见表 25.1A、B，补充材料中的附录Ⅲ；彩版 27e、f）。在预涂 FN/C/BSA 的培养皿用选择培养液 LHC-9 培养，上皮细胞从外植块长出和扩增的效果较佳。正常人气管和支气管上皮细胞的分离和培养方案 25.9-Su 见本章的补充材料。

25.2.10 口腔上皮

用与 LHC-9 和 MCDB 153 类似的选择培养液培养口腔角质形成细胞，并使用 FN/C/BSA 预涂培养皿以促进细胞贴壁。可从公司购买到口腔角质形成细胞（参见表 25.1A、B，补充材料中的附录Ⅲ）。

口腔角质形成细胞培养方案 25.10-Su 见本章的补充材料。

25.2.11 前列腺

许多文献报道，由于人们对于旁分泌生长因子调控细胞增殖和分化特别感兴趣（Yan et al.，1992；Chopra et al.，1996；Thomson et al.，1997），已应用了从前列腺组织分离和培养的细胞（Cronauer et al.，1997；Peehl，2002）。前列腺的上皮细胞，以及成纤维细胞和平滑肌细胞可从公司购买到（参见表 25.1A、B，补充材料中的附录Ⅲ）。

大鼠前列腺原代上皮细胞培养方案 25.11-Su 见本章的补充材料。

25.3 间充质细胞

间充质细胞包括来源于胚胎中胚层的细胞，但不包括造血系统细胞（参见 25.5 节）。间充质细胞包括支架结构（结缔组织、肌肉和骨）和血管（内皮和平滑肌）的细胞及衬附细胞如间皮细胞。鉴于上皮细胞归类为实质细胞，即器官内的主要功能细胞，结缔组织细胞常归类为基质或支撑组织。

25.3.1 结缔组织

一般将结缔组织细胞看作组织培养专家花园中的杂草。结缔组织细胞在大多数机械或酶分离技术处理后能生存下来，并可用许多简单培养液培养，尤其是血清存在时。成纤维细胞可从公司购买（表25.1A、B和图15.5）。尽管被不准确地称为成纤维细胞的细胞已从多种不同组织分离出来，并假定为结缔组织细胞，但是这类细胞的确切鉴定颇不清楚。成纤维细胞系（如鼠3T3细胞）合成Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白，并释放入培养液（Goldberg，1977）。虽然胶原蛋白的产生不局限于成纤维细胞，但合成大量的Ⅰ型胶原蛋白是结缔组织的特征。然而，在骨形成蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）作用下，3T3细胞能被诱导分化为脂肪细胞（Kuriharcuch and Green，1978；Smyth et al.，1993），10T½细胞（另一种小鼠胚胎细胞系）能分化为软骨细胞和骨细胞（Shea et al.，2003）。小鼠胚胎成纤维细胞系（MEF）如常用作饲养层的细胞系3T3和10T½很可能是原始中胚层细胞，可被诱导向多个方向分化。

在形态上，人、仓鼠和小鸡的成纤维细胞与鼠不同。人、仓鼠和小鸡的成纤维细胞在形成单层时呈梭形，特征性地平行排列，而鼠的成纤维细胞呈铺石样。梭形细胞是一种更高度定向分化的祖细胞，故较确切地称为成纤维细胞。如果使NIH3T3细胞处于高密度状态，可变为梭形。

有人提出，成纤维细胞系可来自于血管周细胞，即血管的结缔组织样细胞，但因缺乏合适的标记物难以确定。无疑，命名不准确的成纤维细胞系能从胚胎组织和成年组织分离和培养，但由于未经合适标记物鉴定，这些细胞系不应该看作成纤维细胞，成纤维细胞能够分化为纤维细胞。Ⅰ型胶原蛋白是成纤维细胞的标记物之一。尽管ThyI抗原（Raff et al.，1979）可在某些造血细胞表达，但可被成纤维细胞特异抗体AS02（Dianova）标记（Saalbach et al.，1997）。成纤维细胞也表达脯氨酸羟化酶（Pinnel et al.，1987）。有些成纤维细胞产生旁分泌因子KGF（参见方案25.1-Su后面的角质形成细胞培养特征），如前列腺（Thomson et al.，1997）、小肠（Visco et al.，2009）和皮肤（Mass-Szabowski et al.，1999）中的成纤维细胞。

可用外植块（参见方案11.4、方案11.5-Su）、温胰蛋白酶消化（参见方案11.6）、冷胰蛋白酶消化（参见方案11.7）和胶原蛋白酶消化（参见方案11.9、方案26.9）等传统方法分离胚胎或成年的成纤维细胞。不同来源的成纤维细胞可从公司购买到（见表15.5，表25.1A、B；补充材料中的附录Ⅲ；彩版8a、b）。



彩版8

25.3.2 脂肪组织

虽然从成熟脂肪细胞分离和培养脂肪细胞很困难，但是将间充质细胞以高密度培养几天，可诱导间充质细胞向脂肪细胞分化，如小鼠3T3-L1（Kuriharcuch and Green，1978；Vierick et al.，1996）。血清中的一种脂肪形成因子似乎与这种分化有关。早期传代脂肪细胞包括前脂肪细胞可从公司购买到（参见表25.1A、B，补充材料中的附录Ⅲ）。可通过胶原蛋白酶消化法用大鼠附睾进行脂肪细胞的原代培养。大鼠脂肪垫的原代脂肪细胞培养方案25.12-Su见本章的补充材料。

25.3.3 肌

平滑肌 有人培养了血管平滑肌细胞（Subramanian et al.，1991），并与血管内皮细胞共培养


彩版28

（Jinard et al.，1997；Klinger and Niklason，2006）。平滑肌细胞可从公司购买到（参见表25.1A、B；补充材料中的附录III；彩版28c）。

平滑肌分离和培养方案25.13-Su见本章的补充材料。

心肌和骨骼肌成肌细胞的移植 可用冷胰蛋白酶消化法从鸡胚分离心肌（方案11.6）。培养3天左右，心肌出现收缩现象（Deshpande et al.，1993）。尽管有人培养过人心肌细胞（Goldman and Wurzel，1992），但是将从骨骼肌分离的收缩性和非收缩性细胞移植入梗死心肌是一种治疗急性心肌梗死的新措施。有人已在兔、大鼠、猪、狗和羊移植过这种细胞，证明能够改善心肌功能（Léobon et al.，2003；Menasche，2004；Taylor，2001）。正是由于这些令人鼓舞的研究结果，细胞疗法特别是细胞移植对于几种疾病的治疗带来了希望（Bhagavati and Xu，2004）。

已有人将自体的骨骼肌成肌细胞移植入心肌梗死后瘢痕组织（Menasche et al.，2001）。近来这些研究进展引起人们对于体外成肌细胞增殖和分化的分子机制基础研究产生了新的兴趣（Neumann et al.，2003；Mal and Harter，2003；Anderson and Wozniak，2004；Li et al.，2004；Carvalho et al.，2004），并且近来人们对于将干细胞培养为成肌细胞很感兴趣（Bhagavati and Xu，2004；Seruya et al.，2004；Bossolasco et al.，2004）。

骨骼肌源性成肌细胞 能够培养从几种成年动物骨骼肌分离的成肌细胞。在培养条件下，成肌细胞仍继续表达一些分化特征。成肌细胞称卫星细胞，分化早期的步骤与骨骼肌很相似。成肌细胞在培养底物上增殖和随意迁移，然后呈直线排列，最终融合形成多核的肌管（Richeler and Yaffe，1970；Campion，1984；Hartley and Yablonka-Reuveni，1990）。尽管用胰蛋白酶消化法可将成肌细胞传代培养3~4代，但一旦分化（融合）即不能再传代培养。早期传代骨骼肌成肌细胞可从公司购买到（参见表25.1A、B，补充材料中的附录III，彩版28d）。

两种不同实验方案见本章的补充材料。方案25.14-Su是一种传统方法，即消化和机械性研磨后接种分离的细胞。方案25.15-Su是关于单肌纤维的培养。两种方法都可用于动物细胞培养，但第一种方法也可用于人的细胞培养。然而，第二种方法给予的刺激接近于在体的成肌过程。

在单肌纤维培养中，取整块骨骼肌。用胶原蛋白酶孵育，以消化结缔组织。然后，轻微机械性研磨使肌纤维分离。可从骨骼肌分离出肌纤维及其卫星细胞。这样，可以比较不同肌群在实验过程中的反应，或比较不同年龄和不同遗传基因的骨骼肌。另外，可用SDS凝胶电泳检测单肌纤维的肌球蛋白重链，故能够比较不同肌球蛋白重链类型的肌纤维（Rosenblatt et al.，1996）。

25.3.4 软骨

从几种不同来源的软骨组织培养了软骨细胞，早期几代软骨细胞可从公司购买到（见表25.1A、B；补充材料中的附录III；彩版28a）。软骨细胞是一种来源于间充质细胞的非常特殊的细胞，有着合成、维持和分解软骨基质的功能。大量风湿病学研究一直致力于阐明骨关节炎和风湿性关节炎时诱导关节软骨细胞代谢变化的机制。培养的关节软骨细胞很有用，但以单层形式培养时关节软骨细胞很快分裂，变为成纤维细胞样的细胞，失去原有的生物化学特征（Benya et al.，1977；von der Mark，1986）。从初代开始，关节软骨细胞由合成II型胶原蛋白逐渐转向合成I型胶原蛋白和III型胶原蛋白，并由合成聚集蛋白聚糖逐渐转向合成低分子蛋白聚糖逐渐变化。与细胞表型改变的同时，关节软骨细胞对IL-1β的代谢反应在定量方面受传代培养的影响（Blanco et al.，1995；Lemare et al.，1998）。

用藻酸盐微珠培养软骨细胞的方案25.16-Su和上述引言由Lemare F撰写，见本章的补充材料。

25.3.5 骨

尽管骨难以用机械处理，但能用 EDTA 处理和胶原蛋白酶消化的骨薄片培养成骨细胞（Bard et al.，1972）。培养的成骨细胞具有骨组织的某些功能特征。抗胶原蛋白血清已用于防止成纤维细胞过度生长，而不抑制成骨细胞生长（Duksin et al.，1975）。已经从骨肉瘤获得细胞系（Smith et al.，1976；Weichselbaum et al.，1976），但尚未获得正常成骨细胞系，虽然早期几代细胞系可从公司购买（见表 25.1A、B；补充材料中的附录III；彩版 28b）。可培养间充质干细胞（参见 26.3.4 节和短篇综述 26.2）并诱导形成骨细胞，这适合于组织工程（Lennon and Caplan，2005；Hofmann et al.，2005）和矿化分析（Taylor et al.，2014）。



彩版 28

25.3.6 内皮细胞

内皮细胞培养可以为血管疾病、血管修复和肿瘤的血管新生提供实验模型，也可为组织工程血管提供实验细胞。Folkman 和 Haudenschild（1980）报道，培养的内皮细胞系在体外形成类似毛细血管的三维结构，这提示培养的内皮细胞仍具有重建血管的能力。这一观点被后来的研究所证实（Klinger and Niklason，2006），即平滑肌细胞也参与血管构建。

生长因子对于维持细胞增殖和存活起着重要作用，如体外从 Walker 256 细胞提纯的血管新生因子。由此，内皮细胞可形成血管样结构。由于内皮细胞生长形成单层后增殖受到明显抑制，内皮细胞培养在接触抑制和生长密度限制方面是个很好的模型（Haudenschild et al.，1976）。内皮细胞可从公司购买到（见表 25.1 A、B；补充材料中的附录III；彩版 28e），也可从脐带分离（参见方案 25.17-Su 和图 25.3）。

分离和培养血管细胞方案 25.17-Su 见本章的补充材料。

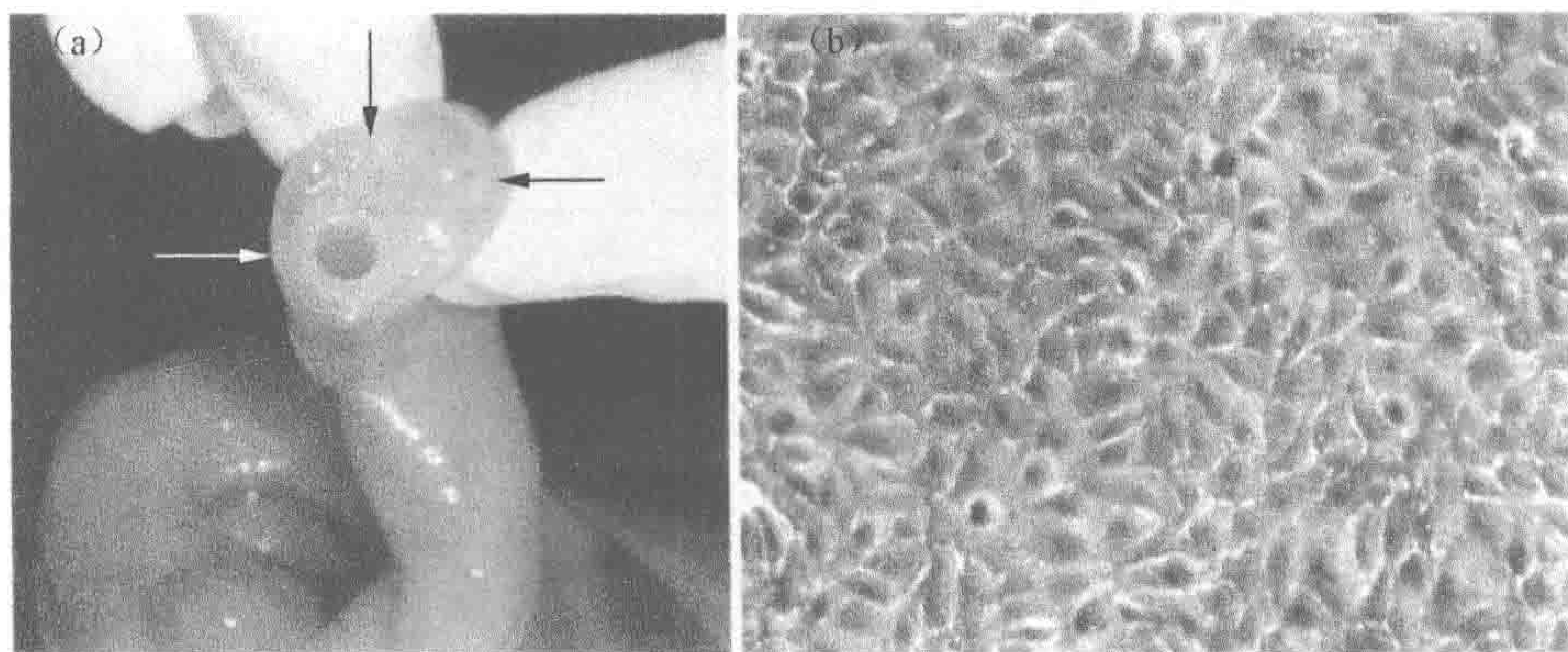


图 25.3 血管内皮细胞。（a）人脐静脉血管的图像。黑箭头示脐动脉，白箭头示插有 Luer 接合管的脐静脉（也可见彩版 8e）；（b）人主动脉内皮细胞单层的相差显微镜图像。10×放大

25.4 神经外胚层细胞

25.4.1 神经细胞

神经细胞在未处理的玻璃或塑料上不能很好地存活，但在胶原蛋白或 D-多聚赖氨酸上面能

向外长出轴突。多肽神经生长因子（nerve growth factor，NGF）（Levi-Montalcini，1979）和神经胶质细胞分泌的其他因子（Marchionni et al.，1993；Barnett，2004；Miklic et al.，2004；Wu et al.，2004；Ernsberger，2008）促进轴突生长。通过在纳米粒上培养能够在体外诱导组成神经（Chen et al.，2010）。在培养的大多数神经细胞未发现细胞增殖，即使在体内有丝分裂明显的胚胎时期细胞。然而，近来关于胚胎干细胞的研究表明在体外能使神经祖细胞增殖（Thomson et al.，1998），在体内再克隆化（Snyder et al.，1992）（彩版25e）。另外，神经系统细胞包括神经元可从公司购买到（参见表25.1 A、B；补充材料中的附录III）。

彩版25

小脑颗粒细胞培养方案25.18-Su见本章的补充材料。

25.4.2 神经胶质细胞

人们已培养过鸟、啮齿动物和人脑的神经胶质细胞。正常成人脑星形神经胶质细胞系表达胶质原纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）（Burke et al.，1996）、摄取高亲和性γ-氨基丁酸（high-affinity γ-aminobuytyric acid，GABA）和摄取谷氨酸盐，具有谷氨酰胺合成酶活性（Frame et al.，1980）。传代培养时少突胶质细胞不容易存活，但能用促有丝分裂剂PDGF和FGF-2对视神经的少突胶质细胞的前体细胞进行传代培养，PDGF和FGF-2为促有丝分裂剂（Bögler et al.，1990）。已用促有丝分裂剂霍乱毒素对施万细胞进行传代培养（Raff et al.，1978；Brockes et al.，1979），但目前发现在含有10%血清的培养液添加神经胶质细胞生长因子和福斯高林时施万细胞生长最佳（Davis and Stroobant，1990）。

星形胶质细胞 是神经胶质细胞中最容易生长的细胞。在20世纪60年代用Uppsala分离的正常组织或肿瘤的神经胶质细胞系可能是星形胶质细胞，但这些细胞系不表达星形胶质细胞的标记物GFAP（Pontén and Macintyre，1968）。然而，有的GFAP⁻细胞系表达其他星形胶质细胞标记物如谷氨酰胺合成酶和摄取β-丙氨酸敏感性GABA（Frame et al.，1980）。其他鉴定神经胶质细胞的标记物是A2B5和Gal-C，前者各种神经胶质细胞都表达，后者在少突胶质细胞特异表达（表25.3）。

表25.3 神经胶质细胞的免疫染色特征

细胞	GFAP	Gal-C	O4	A2B5	NGF
O2-A	−	−	−	+	−
1型星形胶质细胞	+	−	−	−	−
2型星形胶质细胞	+	−	−	+	−
少突胶质细胞	−	+	+[a]	+[a]	−
OEC	+/−[b]	−	+[c]	−	+

a 成熟的少突胶质细胞丢失A2B5，只有Gal-C和O4呈阳性

b GFAP可为纤维样的或无形的。OEC在培养时获得表达GFAP

c 培养时OEC丢失O4

星形胶质细胞可从公司购买到（见表25.1A、B；补充材料中的附录III和彩版28f）。人原代星形胶质细胞培养方案25.19-Su见本章的补充材料。

彩版28

嗅神经成鞘细胞 嗅球是一种很有趣的组织，因为它是哺乳类动物一生中能够支持神经再生的唯一中枢神经系统（central nervous system，CNS）组织（Moulton，1974；Graziadei and Monti-Graziadei，1979，1980）。在正常细胞替换过程中或损伤后，一旦出现神经细胞死亡，新产生的神经细胞来源于嗅上皮内不断增殖的干细胞（Schwob，2002）。这些神经细胞能够产生轴突，分

布于嗅球，重建嗅觉功能。有人认为，嗅球嗅神经层内的神经胶质细胞支持或促进 CNS 内嗅神经轴突的生长（Doucette，1984，1990），这些细胞称为嗅神经成鞘细胞（olfactory ensheathing cell，OEC）。实际上，实验表明，OEC 能使实验去髓鞘损伤的大鼠脊髓再形成髓鞘（Franklin et al.，1996；Imaizumi et al.，1998）和支持被切断的轴突再生（Li et al.，1997，2003a，2003b；Ramon-Cueto et al.，1998）。关于用嗅神经成鞘细胞修复 CNS 已有许多综述（Franklin and Barnett，1997，2000；Raisman，2001；Wewetzer et al.，2002；Barnett and Riddell，2004；Barnett and Chang，2004；Franssen et al.，2008；Roet and Verhaagen，2014）。现在一般认为，OEC 移植的作用是保护神经，而不是促进轴突再生而跨越损伤部位（Toft et al.，2007；Barnett and Riddell，2007）。

上述引言由 Barnett SC（Sir Graeme Davies Building，Room B329，120 University Place，Glasgow G12 8TA，Scotland，UK）撰写。从大鼠嗅球分离 OEC（图 25.4）方案 25.20-Su 见本章的补充材料。

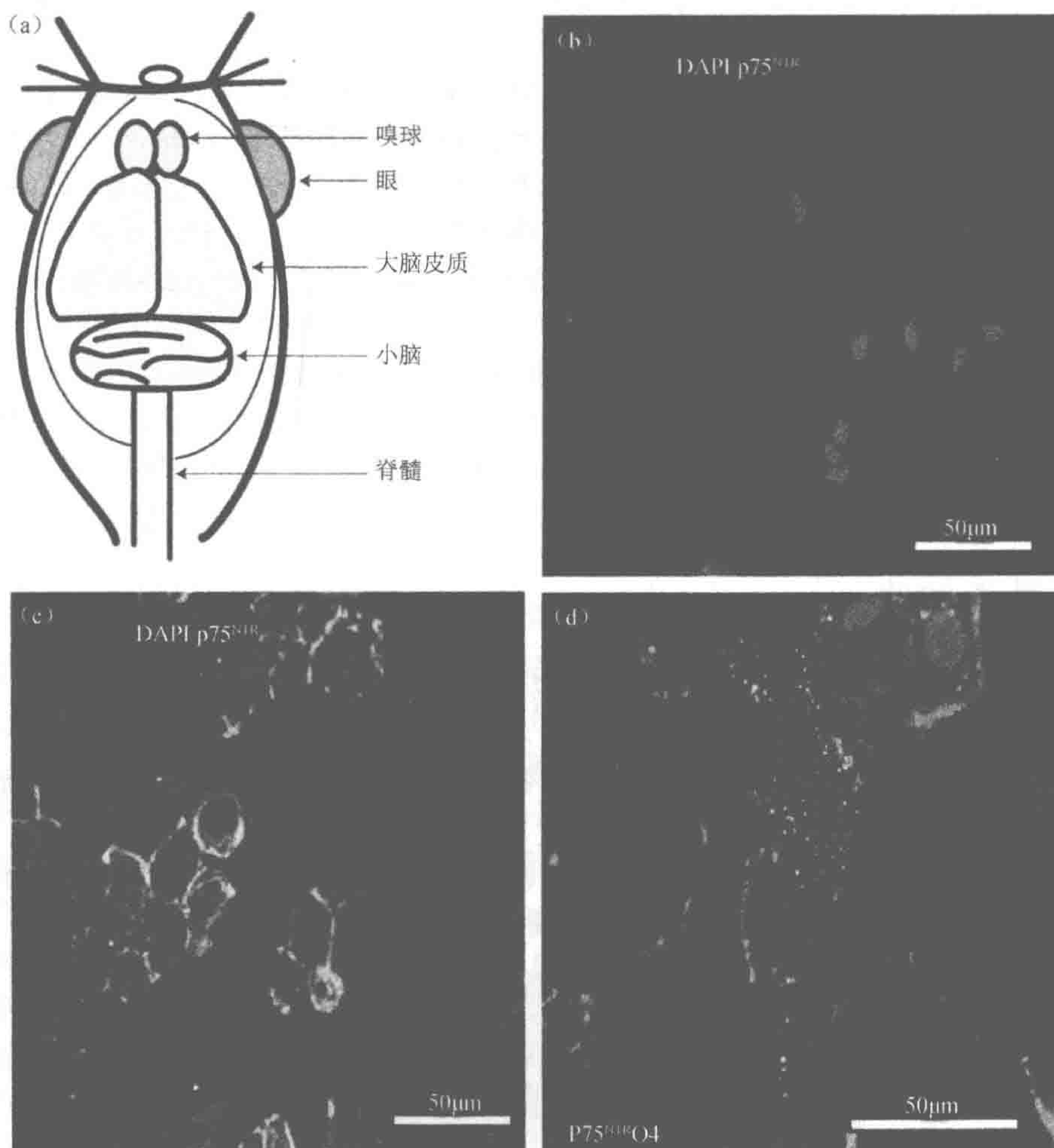


图 25.4　嗅球。嗅球切除和免疫染色。(a) 从新生大鼠脑分离嗅球的简图；(b)～(d) 用 EasyStep 试剂盒标记嗅球组织 $p75^{NTR}$ 的免疫染色，$p75^{NTR}$ 标记用于细胞的前、后纯化。(b) 用酶消化嗅球后，将混合细胞注入预涂多聚赖氨酸的盖玻片上，静止 30min。免疫荧光染色显示很少细胞表达 $p75^{NTR}$；(c) 用 EasyStep 试剂盒纯化的 $p75^{NTR+}$ 细胞约 98%表达 $p75^{NTR}$，这说明该方法对于获得很纯的 OEC 是有效的；(d) 纯化的表达 $p75^{NTR}$ 和 O4 的 OEC。标尺=50μm（Susan Barnett 提供）

25.4.3 内分泌细胞

由于特殊组织内的内分泌细胞数目与其他实质细胞和间质细胞比较相对很少，人们特别重视内分泌细胞培养（O'Hare et al.，1978）的问题。保留功能的早期研究之一是 Sato 和同事（Buonassisi et al.，1962；Sato and Yasumura，1966）用肿瘤机械分离法（Zaroff et al.，1961）进行了大鼠肿瘤的肾上腺细胞和垂体细胞的功能性培养及常规单层培养。细胞功能的完整性可通过间断性传代保留下来，如大鼠肿瘤的细胞（Buonassisi et al.，1962；Tashjian et al.，1968）。这些细胞系完全适应于培养环境，并能在无动物传代的情况下维持生长（Tashjian，1979）。在一些情况下，用完全限制性培养液维持生长（Hayashi and Sato，1976）。Y-1 大鼠肾上腺细胞系（Sato and Yasumura，1966）仍被应用，最近用人肾上腺皮质癌建立了细胞系 NCl-H295（Gazdar et al.，1990；Rainey et al.，2004）。尽管用胶原蛋白酶分离的原代细胞已被应用（Kanczkowski et al.，2009），但正常肾上腺细胞不像细胞系，难以扩增。

在胰岛细胞培养中，乙基汞硫代水杨酸盐处理能减少成纤维细胞（Braaten et al.，1974），也可通过密度梯度离心（Prince et al.，1978）和离心淘洗（Bretzel et al.，1990）纯化胰岛细胞。显而易见，胰岛细胞产生胰岛素，但不如扩增的细胞系。另外，有人已短期或长期培养非胰岛细胞，这种细胞在无血清培养液中可向胰岛素分泌细胞分化（Gao et al.，2003；Dorrell et al.，2008）。近来的研究焦点趋向于从干细胞培养 β-胰岛细胞（Evans-Molina et al.，2009；Huch et al.，2013）。

已从小鼠分离了数代能产生垂体激素的垂体细胞（Sato and Yasumura，1966；de Vitr et al.，1974）。尽管正常人垂体细胞不容易存活，并且培养的大多数垂体腺瘤细胞逐渐丧失合成激素的能力，但是部分细胞继续产生生长激素（Bossis et al.，2004），三维培养的垂体腺瘤细胞继续分泌催乳激素（Guiraud et al.，1991）。

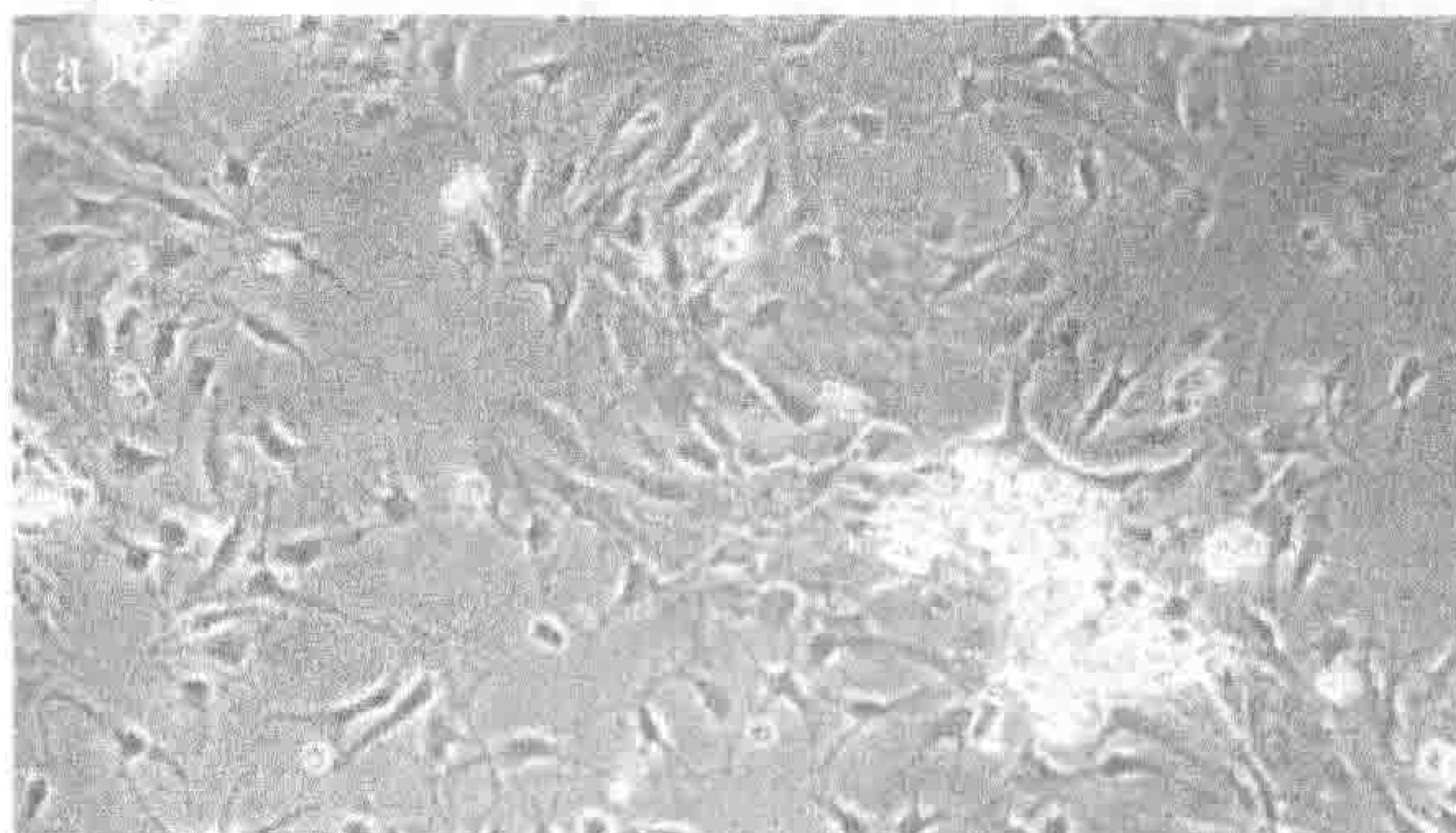
25.4.4 黑素细胞

人们对于表皮黑素细胞产生很大兴趣源于黑色素瘤（Halaban，2004）（见 25.16.9 节）、黑素细胞生长（Dupin et al.，2003；Aoki et al.，2005）和用黑素细胞补充角质形成细胞移植（Liu et al.，2004；Klar et al.，2014）的研究。已有许多关于葡萄膜黑素细胞及其在紫外线放射、毒理学（Hu et al.，2002）和眼疾病（Dawson-Baglien et al.，2014）方面作用的研究。



彩版27

黑素细胞培养方案 25.21-Su 见本章的补充材料，照片如图 25.5 所示。人黑素细胞也可从公司购买（见表 25.1A、B；补充材料中的附录Ⅲ；彩版 27b）。



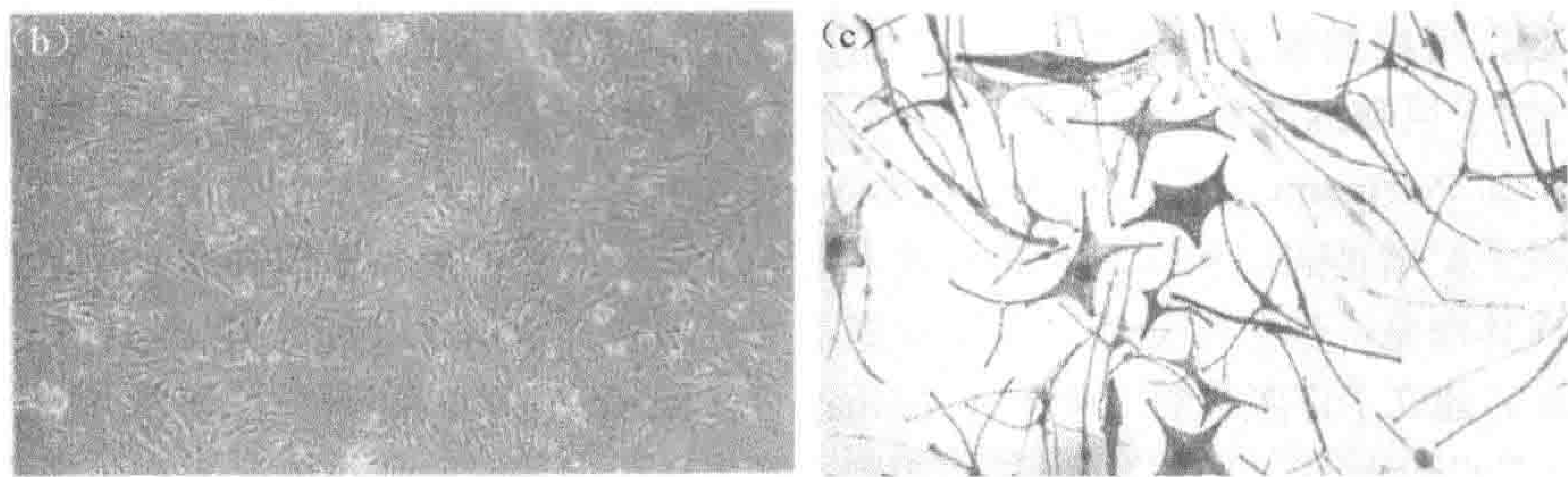


图25.5 培养的黑素细胞。(a) 培养1周后的从高加索人新生儿包皮分离的黑素细胞。可见角质形成细胞克隆，中央的细胞为复层，外周的表皮细胞紧密排列。黑素细胞为较小的黑色树突状细胞，大多数黑素细胞通过树突状突起与角质形成细胞克隆联系（相差显微镜照片，100×）；(b) 在不含TPA的培养液中原代培养10天的高加索人新生儿表皮黑素细胞。许多细胞有树突状分支，其他细胞呈双极或多角形（相差显微镜照片，40×）；(c) 用TPA处理的第2代非洲-美洲人新生儿包皮的表皮黑素细胞。细胞呈树突状和细梭形。与从高加索人新生儿包皮分离的细胞相比，这些黑素细胞含有较多的黑色素颗粒（相差显微镜照片，320×）。也可见彩版8d。上图中的照片由Hee-Young Park提供



彩版8

25.5 造血细胞

已通过集落形成培养（参见26.4.1节）、骨髓细胞长期培养和连续细胞系培养等方法培养造血细胞（Freshney et al.，1994；Klug and Jordan，2002）。这些培养方法的大多数步骤涉及克隆造血干细胞和祖细胞，将在26.4节叙述。

25.5.1 红细胞

Rossi和Friend（1967）提出，小鼠RNA病毒（“Friend病毒”）能引起被感染小鼠的脾肿大和幼红细胞增多。在某些情况下，能用从这些动物切除的脾培养的细胞产生红白血病连续细胞系。所有这些细胞系可用现已确认来源于 Moloney 肉瘤病毒的缺陷病毒和辅助病毒的复合体进行转化（Ostertag and Pragnell，1978，1981）。一些细胞系能产生病毒，这种病毒在体内具有感染性，但在体外不具有感染性。这些细胞系也可在DBA2小鼠和BALB-C小鼠以固体瘤或腹水瘤形式传代。

用DMSO、丁酸钠、异丁酸和环己烷双己酰胺等试剂处理培养Friend细胞可促进红细胞的分化（Friend et al.，1971；Leder and Leder，1975）。未处理的细胞与未分化的原始红细胞相似，而处理过的细胞出现核浓缩、细胞体积减小和血红蛋白聚集（参见19.7.2节），可致离心过的细胞呈红色。通过联苯胺对血红蛋白染色（彩版13a、b）和珠蛋白特异性mRNA的原位杂交（彩版13c、d）能显示细胞分化。丁酸钠和血红素能诱导人白血病细胞系K562的分化，而DMSO无作用（Andersson et al.，1979c）。



彩版13

25.5.2 髓细胞和巨噬细胞

通过在酶消化分散过程中收集贴壁细胞，可从许多组织分离巨噬细胞。然而，用这种方法获得细胞很少。为了获得大量巨噬细胞已发明了很多技术。可将矿物油和硫代乙醇酸盐（Marques da Silva，2008；Takahashi et al.，2009）注入小鼠腹膜腔，3天后冲洗腹膜，将获得高含量的巨噬细

胞。如有必要，可根据细胞附着于培养底物的能力，在有蛋白酶的情况下纯化巨噬细胞（参见16.7.1 节）。由于巨噬细胞对胰蛋白酶不敏感，巨噬细胞传代较困难。人们用疏水塑料制品改进了培养方法，如 Petriperm 培养皿（Greiner Bio-one）。

有一些关于扩增过的巨噬细胞系的报道，这些细胞系大多数来源于鼠肿瘤。尽管有可能培养成可增殖的前体细胞，但正常的成熟巨噬细胞不增殖（参见 26.4.1 节和方案 26.10-Su）。

从鼠白血病建立了许多骨髓细胞系（Horibata and Harris，1970）。研究已表明，如同一些人淋巴母细胞系（Collins et al.，1977），鼠骨髓细胞系产生球蛋白链，在某些情况下产生完整的 α-球蛋白和 γ-球蛋白（参见 27.7 节）。这些细胞系中的一部分可用无血清培养液培养（Iscove and Melchers，1978）。髓系细胞系最有意义的应用在于利用骨髓瘤细胞系产生杂交瘤（参见第 25.6 节）。

25.5.3 淋巴细胞

最初的人类淋巴母细胞系是通过高密度（约 10^6/mL）和深培养（大于 10mm）来培养外周血淋巴细胞而建立的（Moore et al.，1967）。随后，研究表明细胞永生化是 EB 病毒引起的，目前，增殖技术可用于此过程（MacDonald，1994；Bolton and Spurr，1996）。

淋巴细胞的短期培养方法已建立一段时间，它可用于染色体制备、抗原刺激及上述细胞系的建立。通常是通过密度分离来制备淋巴细胞。

用于淋巴细胞分离的方案 25.22-Su 及 PHA 刺激淋巴细胞的方案 25.23-Su 都收录在本章的补充材料中。

25.6 单克隆抗体的制备

单克隆抗体是由骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞杂交而来的克隆细胞系所生产的，已成为科学研究、疾病诊断和治疗不可缺少的工具。自 Kohler 和 Milstein 于 1975 年发明了杂交瘤技术后，单克隆抗体已在许多应用方面取代了多克隆抗体。用于制备单克隆抗体的新杂交瘤建立技术可见本章补充材料，如 B 细胞靶向技术（方案 25.24-Su）和立体特异性靶向技术（方案 25.25-Su）。还可参见图 25.6~图 25.8。

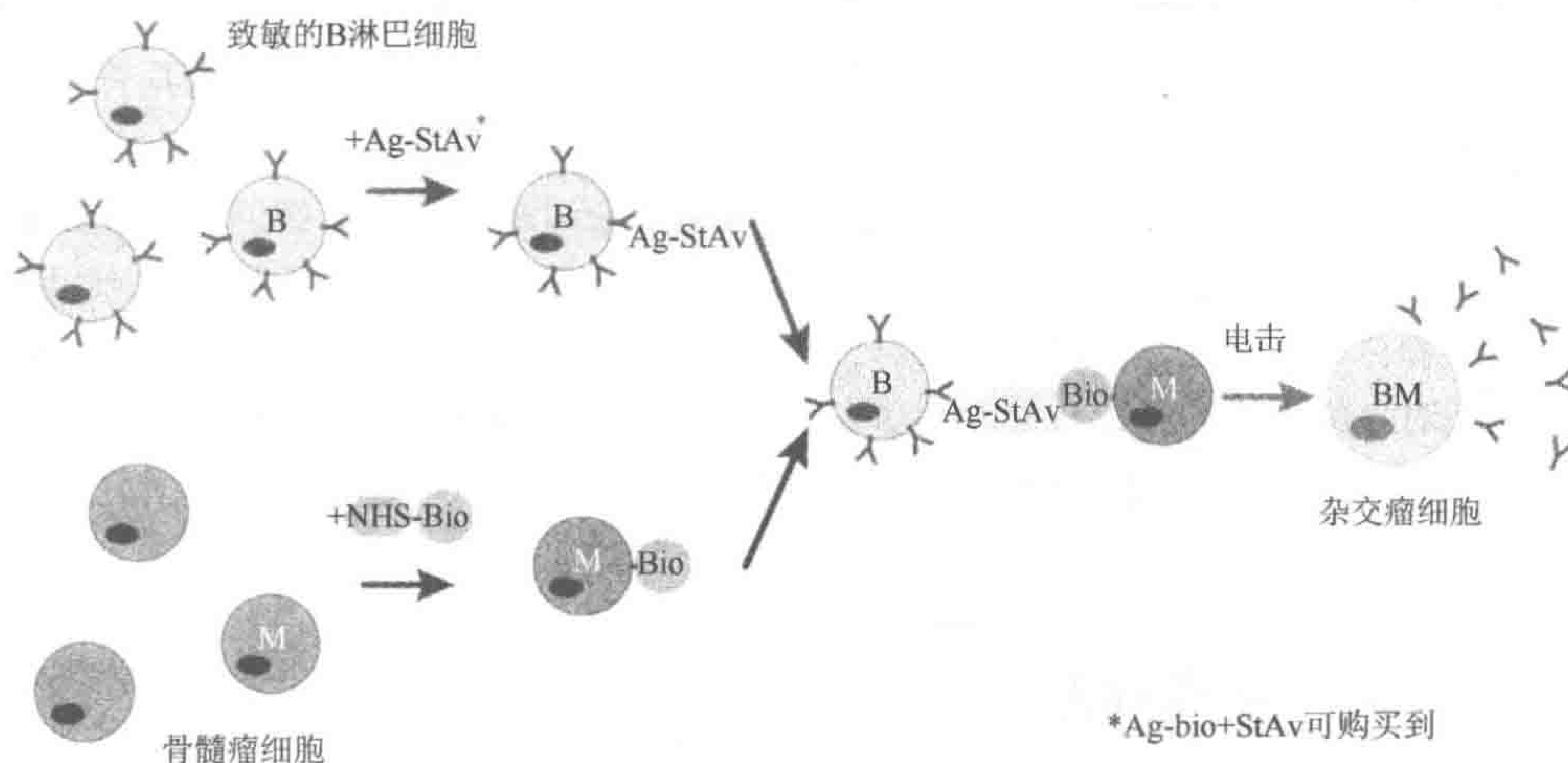


图 25.6 B 细胞靶向（BCT）技术。通过生物素与抗原结合或抗原与链霉亲和素结合进行腹膜腔内选择性免疫，使 B 淋巴细胞致敏。经生物素与链霉亲和素相互作用，抗原选择的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞结合。最后利用电击使 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞复合体融合成分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞

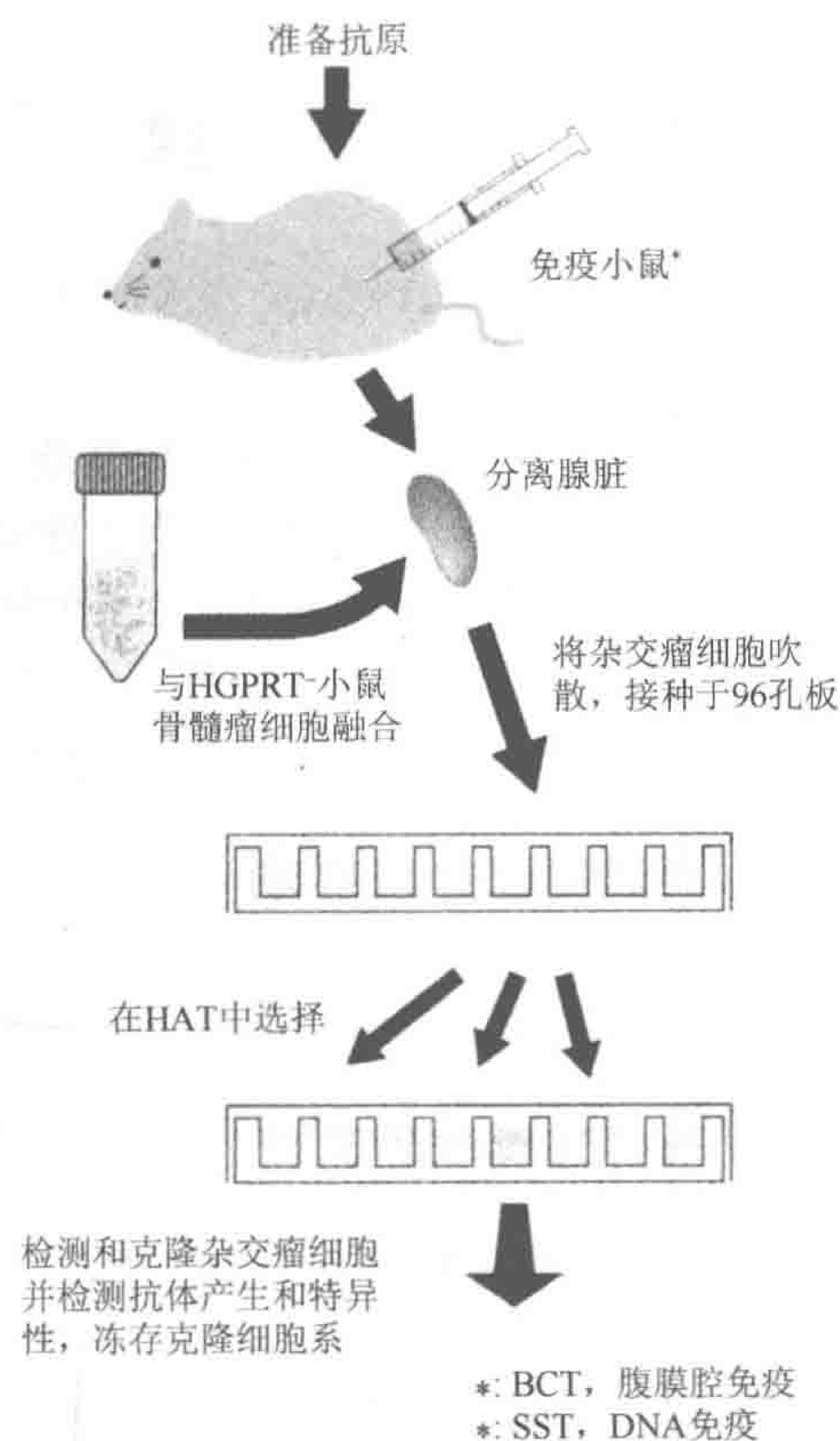


图 25.7　杂交瘤细胞的融合和克隆。基于 BCT 或 SST 技术，免疫的 B 淋巴细胞在电作用下与骨髓瘤细胞融合。用 ELISA（酶联免疫吸附测定）或基于细胞的 ELISA 检测分泌单克隆抗体或立体定向单克隆抗体的杂交瘤细胞。采用有限稀释法克隆阳性杂交瘤细胞，并检测亲合力和特异性。最后，克隆的杂交瘤细胞放于液氮中保存

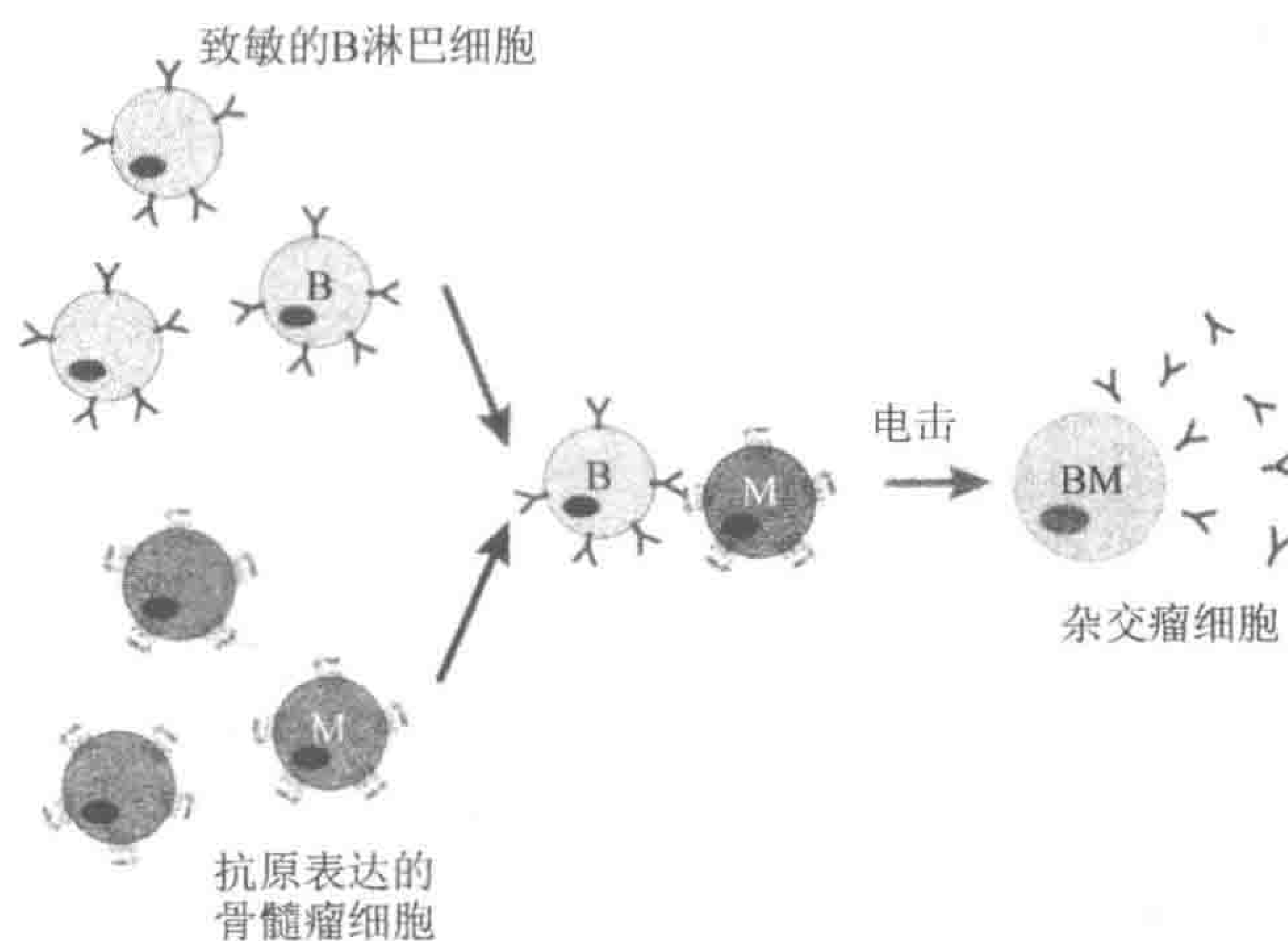


图 25.8　立体特异性靶向（SST）技术。DNA 免疫后的致敏 B 淋巴细胞被抗原表达的骨髓瘤细胞选择。然后，利用电击使 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞复合体融合，产生分泌立体定向单克隆抗体（ssmAbs）的杂交瘤细胞

25.7 生 殖 腺

25.7.1 卵巢

在原代培养中能维持卵巢颗粒层细胞的生长和明显的功能活动（Orly et al.，1980），但在传代培养时细胞的特殊功能丧失。从中国仓鼠卵巢建立的细胞系CHO-KI（Kao and Puck，1968）已经培养许多年，但其谱系仍未被鉴定。尽管这个细胞系在一些生长阶段呈上皮细胞样，但用双丁酰环腺苷酸培养时变为成纤维细胞样（Ilsie and Puck，1971）。另外，已分离出人卵巢的表面上皮细胞，并用hTERT永生化（参见方案22.2），这种细胞保留pRb和p53的功能性表达（Li et al.，2007）。已观察到某些表面上皮细胞能够发育成熟为卵母细胞（Virant-Klun et al.，2008）。

25.7.2 睾丸

现已从人的睾丸分离出支持细胞、精原细胞和精母细胞等多种细胞，用于研究激素对于精子发生和细胞相互联系的调控作用（Śa et al.，2008）。TM4是从小鼠支持细胞建立的细胞系（Mather，1979；Kato et al.，2009），TM3是来源于小鼠Leydig细胞的细胞系（Matsumoto et al.，2008）。另外，已从人睾丸分离出多潜能干细胞（Conrad et al.，2008）（参见23.2节），用于研究生殖细胞功能维持和精子发育的生长因子调控作用（Huleihel et al.，2007）。

25.8 冷血动物细胞的培养

冷血动物细胞的培养方法与温血动物细胞的培养方法是类似的，这主要由于当今的许多经验来自于对鸟和哺乳类动物细胞的培养。因此，原代培养的分离技术都使用蛋白酶，如胰蛋白酶和EDTA（螯合剂）的混合液。胎牛血清能很好地取代同种血清或血淋巴液，并较容易获得。但是，改良的培养基可改善细胞生长。许多这样的培养基可由供应商提供（参见补充材料中的附录III）。用这些培养基的操作过程与哺乳类细胞基本相同。尽量使用当前流行的培养基和血清，检测细胞生长、接种效率和特殊功能（参见8.6节和9.6节）。既然许多非脊椎动物细胞系培养基的研发均处于初始阶段，故如果检测未培养过的非脊椎动物或组织的细胞，需要发明新的培养基。迄今为止，积累的大部分经验涉及昆虫和软体动物。

除鸟和哺乳类动物外，冷血脊椎动物的细胞培养也遵循温血脊椎动物的操作程序，到目前为止，在技术方面没有太大差别。由于这是一个发展的领域，仍需要考虑一些基本的参数以便提供最佳的培养条件。如果研究一个新种动物，需要建立细胞生长的最佳条件，如pH、摩尔渗透浓度（以动物种类而不同）、营养物质和矿物浓度。温度可能不太重要，但应在适当的环境范围固定下来，调节范围为±0.5℃，过热对细胞非常有害。

有两篇综述概括了无脊椎动物组织培养的一些早期发展（Vago，1971，1972；Maramorosch，1976），之后有关鱼和无脊椎动物的研究的综述可参阅*In vitro Cellular and DevelopmentaL Biology, Animal*（Smagghe and Goodman，2009）。Mothersill和Austin（2000）则回顾了水生无脊椎动物细胞的培养。

25.8.1 鱼细胞

由于鱼类养殖的商业利益不断增大，以及海洋环境和水质毒性问题，鱼细胞的培养日趋广泛（Lee et al.，2009）。Lee 等罗列出了 31 种 ATCC 可供应的鱼类细胞系。此外，在文献中报道有其他数种细胞系，范围广泛，包括金鱼、鲶鱼、斑马鱼、三文鱼、鳟鱼、鲤鱼和黑头呆鱼。鱼细胞系已应用于研究微孢子虫的感染（Monaghan et al.，2009），脾细胞系 ZSSJ 也已建立，并成为鱼 ES 细胞的饲养层细胞（Xing et al.，2009）。现已可提供由斑马鱼胚胎建立 ES 细胞培养的方案，其中包括鱼胚胎成纤维细胞饲养层的制备（参见方案 26.4-Su）。

25.8.2 昆虫细胞

一段时间内人们对于将培养昆虫细胞用于研究控制瘟疫和环境毒理学产生了浓厚的兴趣（Smagghe et al.，2009）。然而，昆虫细胞培养应用的显著增加是杆状病毒用于基因克隆所致（Midgley et al.，1998）。本章补充材料提供了 Sf 细胞培养方案（方案 25.5-Su）。

25.9 肿瘤细胞培养

肿瘤细胞的培养存在着与正常组织中特殊细胞培养相类似的问题，尤其是人原发性肿瘤细胞。肿瘤细胞必须与正常的结缔组织细胞分开，最好通过使用支持肿瘤细胞生长而不支持正常细胞生长的选择培养基进行分离。尽管正常细胞选择性培养基的研制有了很大进展（参见 9.2 节和 25.1 节），但肿瘤细胞培养的进展受到肿瘤组织样本间和样本内，甚至相同肿瘤类型的各种变异的限制。常惊奇地发现，肿瘤在体内容易生长，但在体外难以生长，这主要是因为肿瘤在体内生长具有显著性自主调控，而不是正常性调控。

有些肿瘤细胞难以存活可能有许多原因。这些肿瘤细胞的营养需求不同于同等组织的正常细胞，或许除去间质实际上可能使肿瘤细胞失去了存活必需的基质、营养物质或信号。另外，对肿瘤细胞的稀释可为每个细胞提供足够的营养，但也可能由此稀释了细胞产生的自分泌生长因子。严格来讲，如果自分泌因子释放至细胞表面并作用于同一细胞，真正的自分泌因子不会受稀释的影响。但是，某些所谓的自分泌生长因子实际上可能是同分泌因子（参见 2.5 节），即这些因子作用于邻近的同类细胞，而不是作用于释放这些因子的细胞本身。因此，需要有密切相互作用的细胞群。如果间质能够自发地或对肿瘤细胞反应后产生需要的生长因子，则与某些类型的间质细胞相互作用可提供它们存活必需的旁分泌作用。

认为肿瘤细胞对生长因子的依赖性类似于肿瘤周围组织的正常细胞可能是不正确的。肿瘤细胞能够产生内源性自分泌生长因子（如 TGF-α），给予外源性生长因子（如 EGF）可竞争结合相同受体。另外，肿瘤细胞对一种生长因子或激素的反应将取决于其他生长因子的存在和细胞状态，有些其他生长因子可能是肿瘤细胞释放的。能够表达生长抑制和衰老基因的正常细胞，与含有一个或多个不活化或发生突变基因细胞的反应可能不同于与高表达促进生长癌基因细胞的反应。

因此，有许多可能的原因使肿瘤细胞对于营养和代谢环境的反应不同于同一谱系的正常细胞。为了证实这种差异，在肿瘤细胞的基因类型和营养需要方面应掌握更多的信息。但是，出于肿瘤异质性（图 22.1 和彩版 7），该研究颇为棘手。因为迄今由不同肿瘤细胞系营养需要的知识


彩版 7

尚不是十分有益于取得潜在性治疗效果，所以更多强调研究肿瘤细胞对生长因子的反应和信号转导的差异。

由于遗传变异、终末分化、凋亡或自然衰老，肿瘤内大部分细胞的寿命可能有限，仅有少数肿瘤细胞类似于正常组织的干细胞，具有持续存活的潜在性。稀释培养不仅可降低这些肿瘤细胞与其他细胞的相互作用，而且减少了这些细胞的数目，以致细胞不可能存活。与原核生物不同，多细胞动物的细胞在分离状态下不容易存活，即使肿瘤是一个多细胞器官，其存活还需要连续的细胞间相互作用。肿瘤对于宿主的致死性在于无限制地浸润和克隆生长，但大部分肿瘤细胞可能起源于数目相当少的转化干细胞（Jones et al., 2004; Al-Hajj et al., 2004; 26.6 节和短篇综述 26.3）。肿瘤干细胞池很小，以致移植时的稀释可使其失去存活的某些必要条件，尤其是由基质细胞产生的旁分泌生长因子，以及与其他亚克隆肿瘤细胞的同分泌相互作用。

总之，目的是建立正确的限定性营养和激素环境，或者即使不能做到也可提供一个维持性环境，能够使合适细胞或典型细胞群存活。为了使肿瘤细胞生长，人们一直倾向于使用血清和饲养层，仅有少数肿瘤适应于无血清培养。由于 TGF-β 不能抑制许多转化细胞生长，除抑制成纤维细胞生长外，没有必要总是去除血清，而这仍是一个主要问题。用适合于同等正常细胞的培养基从肿瘤获得细胞系仍然是最符合逻辑的方法，即使添加少量血清或其他细胞的条件培养液（Dairkee et al., 1995）。

25.10 取　材

25.10.1 代表性细胞的选择

由于许多肿瘤刺激结缔组织和血管的细胞侵袭与增殖，转化细胞与正常同等组织的细胞可能具有类似的特征。除预防结缔组织和血管的细胞过度生长，肿瘤细胞培养需要将转化细胞与正常同等组织的细胞分离开来。此外，虽然胃上皮的任何一张切片可看作胃黏膜特殊部位的代表，但由于肿瘤发生取决于遗传变异和自然选择，肿瘤组织通常是异质性的，常由许多不同表型的亚克隆组成。难以保证从这种异质性细胞群中得到的培养细胞具有代表性，除非利用整个肿瘤并且其存活率是 100%。实际上不可能达到这些条件，所以一般水平的肿瘤细胞培养是一种折中方法。假设存在具有代表性的亚群细胞并能相互作用，其共性可能类似于原有肿瘤。另外，如果干细胞是治疗的主要靶点，这种干细胞可能就是关键的代表性靶细胞。如果在干细胞分化而来的几个子细胞中出现异质性，或许也是比较同质的。

从转移性肿瘤取材时应强调选择性问题。取材的转移性肿瘤常生长良好，但可能比不上原发性肿瘤或其他转移性肿瘤那么典型。然而，推测转移肿瘤发生与干细胞的异位发育具有相似性令人很感兴趣（参见 26.3.3 节）。

鉴于上述有关肿瘤培养的这些重重困难，迄今在此领域所得到的各种可靠资料几乎都是令人惊叹不已的。事实上，已有从下列方面得出可靠资料：①前述的肿瘤细胞自律性可使肿瘤细胞在正常细胞不繁殖的条件下增殖；②肿瘤内的增殖池扩大，大于大多数正常组织；③在免疫缺陷小鼠中，肿瘤细胞作为异种移植物具有产生肿瘤的能力，培养从异种移植肿瘤得到的肿瘤细胞较为成功；④恶性转化细胞形成连续性永生细胞系的倾向比正常细胞更为常见。与其他特征相比，此特征更有利于广泛研究恶性转化细胞群，甚至对那些显然正常的分化过程，尽管这些转化细胞与其来源肿瘤的关系还不确定。

25.10.2 组织的冷冻保存

通常难以利用较大的活检标本和由其提供的一切有价值的材料。在这些情况下，可通过冷冻保存组织（方案25.27）。

方案25.27 冻存活检组织

概要

切取肿瘤，将肿瘤块浸于DMSO，然后分量冻存于液氮中。

材料

无菌

- 活检标本
- 1.2mL塑料冻存管（Thermo-Nunc）
- DBSS（参见附录Ⅰ）
- 收集液（参见附录Ⅰ）
- DMSO（如果放在一个无菌容器中，为半灭菌的）
- 器皿（手术刀、解剖镊、培养皿等，同原代培养）

操作步骤

1. 除去坏死组织、脂肪和纤维组织后，将肿瘤切成3~4mm的小块。同原代培养，将肿瘤块放入DBSS中清洗。
2. 在每个冻存管中放入4或5个肿瘤块。
3. 将1mL含有10% DMSO的生长培养液加入到放有肿瘤块的冻存管中，在室温下放置30min。
4. 将冻存管按1℃/min冷冻（参见方案15.1），然后将冻存管移入液氮罐。为了避免爆炸危险，不要将冻存管浸入液氮。
5. 为了融化冻存管，将其放在37℃温水中（要有适当的预防措施，见方案15.2）。
6. 用乙醇将冻存管彻底擦拭后打开，使肿瘤块沉淀后，吸出一半培养液。
7. 缓慢补充不含DMSO的新鲜培养液，轻轻摇动混合后放置5min。
8. 用不含DMSO的培养液逐渐置换全部的培养液，然后将组织块移入Petri培养皿，按常规原代培养方法进行操作，但每培养瓶中放入两倍多组织块。

25.11 分 离

有些肿瘤如人卵巢癌、某些胶质瘤和许多可移植的啮齿类肿瘤很容易通过单纯的机械方法分离，如吹打和过滤（参见11.3.8节）。由于基质细胞常被紧密地包围在纤维结缔组织中，机械性

分离也有助于减少基质细胞污染。然而，许多常见人癌的组织是坚硬的或是硬癌样的，肿瘤细胞包埋在大量的纤维基质中，难以进行机械分离，尽管刮取硬癌样肿瘤的剖开表面，即剥落技术已成功地用于从纤维基质分离肿瘤细胞（Lasfargues，1973；Oie et al.，1996）。

已证明在大多数情况下酶消化法优于机械分离法。虽然胰蛋白酶常用于细胞分离，但是在消化纤维结缔组织方面的作用受到限制，并降低培养效率（Lounis et al.，1994）。有人发现，天然的胶原蛋白酶对于几种不同类型的肿瘤更有效（Dairkee et al.，1997）。酶消化分离同时使许多基质细胞脱落，需采取选择性培养技术除去基质细胞（见25.13节，图17.6d，彩版23）。胶原蛋白酶的消化时间在完全培养液中可为几小时甚至几天（参见方案11.9）。

彩版23

另外一个问题是肿瘤组织广泛性坏死，这在正常组织是不常碰到的。通常情况下，存活细胞贴壁有利于换液时除去坏死物质。但是，如果坏死物质较多，分离时不容易除去，建议此时使用Ficoll-metrizoate分离法（参见方案11.11），以除去坏死细胞。

25.12 原代培养

有些细胞如巨噬细胞在胶原蛋白酶消化过程中附着于底物上，但吸出胶原蛋白酶后将分离的细胞悬液转换到新的培养瓶，即可除去巨噬细胞。贴壁细胞可以保留下来，分别进行培养、照射或用丝裂霉素C处理，用作饲养层细胞（见16.2.3节；彩版6d，彩版11a和彩版15b；方案25.1-Su和方案25.4-Su）。再接种的细胞会含有许多基质细胞，主要为成纤维细胞和内皮细胞。因为肿瘤细胞尤其是恶性上皮细胞簇需要更长的时间才能贴壁，部分基质细胞在2~4h第2次转换到新培养瓶可被除去。但是，这种通过连续转换的去除方法一般仅部分成功，要完全除去基质细胞通常需要选择培养条件。然而，这种方法有利于将基质细胞保留下来用作饲养层细胞和基因表达谱检测DNA来源。

彩版6

彩版11

彩版15

物理性分离技术也已用于排除基质细胞污染（Csoka et al.，1995；Oie et al.，1996）（参见第17章）。但一般来说，这些方法仅适用于立刻使用细胞时，这是由于在缺乏选择培养条件的情况下，通常随后发生基质细胞的过度生长。然而，用抗成纤维细胞免疫磁珠（图17.6d，Miltenyi Biotec）的磁式分离（参见17.3.2节和彩版23）很有效。

彩版23

由于原代培养的肿瘤细胞的平皿效应常常较低（<0.1%），克隆培养作为纯化方法具有某些局限性。在过去，有人提出悬浮克隆培养不仅作为肿瘤细胞分离方法，而且作为肿瘤干细胞分离方法（Hamburger and Salmon，1977）。然而，当克隆生长到足够的数量并有潜在性分析价值时，这个克隆可能发生了较大变化，甚至由于遗传不稳定性可能已变为异质的。应集中研究从肿瘤分离的克隆细胞群，甚至通过复合培养，以便得出有意义的解释。

在由原代培养的克隆扩增细胞系方面也存在着一些困难，特别是由用悬浮方法分离的克隆扩增细胞系。或许虽然这些细胞是克隆形成细胞，但几乎没有细胞真正属于干细胞。假使这些细胞是干细胞，由于悬浮生长而自然成熟，丧失了再生能力。然而，直接从肿瘤克隆的细胞株对于研究肿瘤克隆的多样性和相互作用是有价值的材料，这些细胞株代表未来研究的关键性领域，特别是如果能够将选择性条件用于分离肿瘤干细胞的话则更是如此（见第26.6节和短篇综述26.3）。

25.13 肿瘤细胞的选择培养

下面 3 种方法主要适于在原代培养中筛选肿瘤细胞：选择培养基（参见 9.2 节和 16.6 节）、汇合饲养层（参见 16.7.4 节和 25.13.2 节）和悬浮克隆（参见 16.3 节）。

25.13.1 选择培养基

由于肿瘤细胞固有的变异性和异质性问题，人们仅发明了几种肿瘤细胞的选择培养基。HITES（表 9.2）（Carney et al.，1981）即是一种这样的培养基，可将这种培养基的发明归功于小细胞肺癌产生的肽类生长因子。为了培养小细胞肺癌的细胞发明了这种培养基。只有一部分小细胞肺癌活检标本的细胞能在纯 HITES 中生长，其他活检标本的细胞在添加低浓度血清的培养液中才能存活，如 2.5%血清。HITES 培养液是变更的 RPMI1640，含有氢化可的松、胰岛素、转铁蛋白、雌二醇和硒。在这些成分中，硒、胰岛素和转铁蛋白可能是很重要的，也添加入许多无血清培养基（表 9.2）。NCI（美国国家癌症研究所）的研究小组也生产了一种选择性腺癌培养基，很适合于肺癌和结肠癌，并可能适合于许多其他癌（Brower et al.，1986）。这种培养基也是基于 RPMI1640，除含有硒、胰岛素和转铁蛋白外，还添加氢化可的松、EGF、三碘甲腺原氨酸、BSA 和丙酮酸钠、硒、胰岛素和转铁蛋白（表 9.2）。其他选择性培养液已成功地用于前列腺癌（Uzgare et al.，2004）、膀胱癌（Messing et al.，1982）和乳腺癌（Ethier et al.，1993）的细胞培养。

其他类型的选择性培养基取决于对成纤维细胞的代谢性抑制（表 25.3），而并不是对于任何特殊类型的肿瘤都特别理想（参见 16.6 节）。然而，除 Edwards 等（1980）和 Paraskeva 等（1985）使用了抗成纤维细胞的单克隆抗体外，尚未发现普遍有效的抑制剂。已证明这些抗体在建立喉和结肠癌的细胞培养时是有用的。通过摇动或磁珠分选法从肿瘤细胞悬液进行阳性选择上皮细胞或阴性分选基质细胞时，也已证明抗体是很有用的（参见 17.3.1 节；图 17.6d；彩版 23）。


彩版 23

25.13.2 汇合饲养层

汇合饲养层（参见 16.7.4 节；图 16.5；彩版 6c、d）已成功地应用于多种肿瘤细胞的培养（方案 25.28）。利用人胎儿小肠的汇合饲养层 FHS74Int 和其他细胞系的条件培养基培养了哺乳类癌的上皮细胞（Lan et al.，1981），尽管后来的报道提出用 MCDB 170 选择培养是一种更有效的方法（Hammond et al.，1984）。小鼠 3T3 或 STO 胚胎成纤维细胞饲养层已成功地应用于乳腺癌、结肠癌和基底细胞癌的细胞培养（Rheinwald and Beckett，1981；Leake et al.，1987）。


彩版 6

饲养层技术取决于通过其他接触抑制细胞形成的单层（图 25.9）预防成纤维细胞的过度生长。饲养层技术并不能选择性抑制正常上皮细胞，因为正常表皮细胞和正常乳腺上皮都能在汇合的饲养层上形成克隆（图 25.10）。然而，神经胶质瘤研究的结果（MacDonald et al.，1985）表明，在同种饲养层上选择性抑制等同的正常细胞是可能的。将神经胶质瘤细胞种植在正常胶质细胞饲养层上，不发生正常胶质细胞的污染。根据同样结论，种植在汇合的正常乳腺上皮细胞培养物，如从乳房成形术获得的正常乳腺上皮细胞（参见方案 25.3-Su）上的乳腺癌细胞能够避免任何正常上皮细胞的污染。

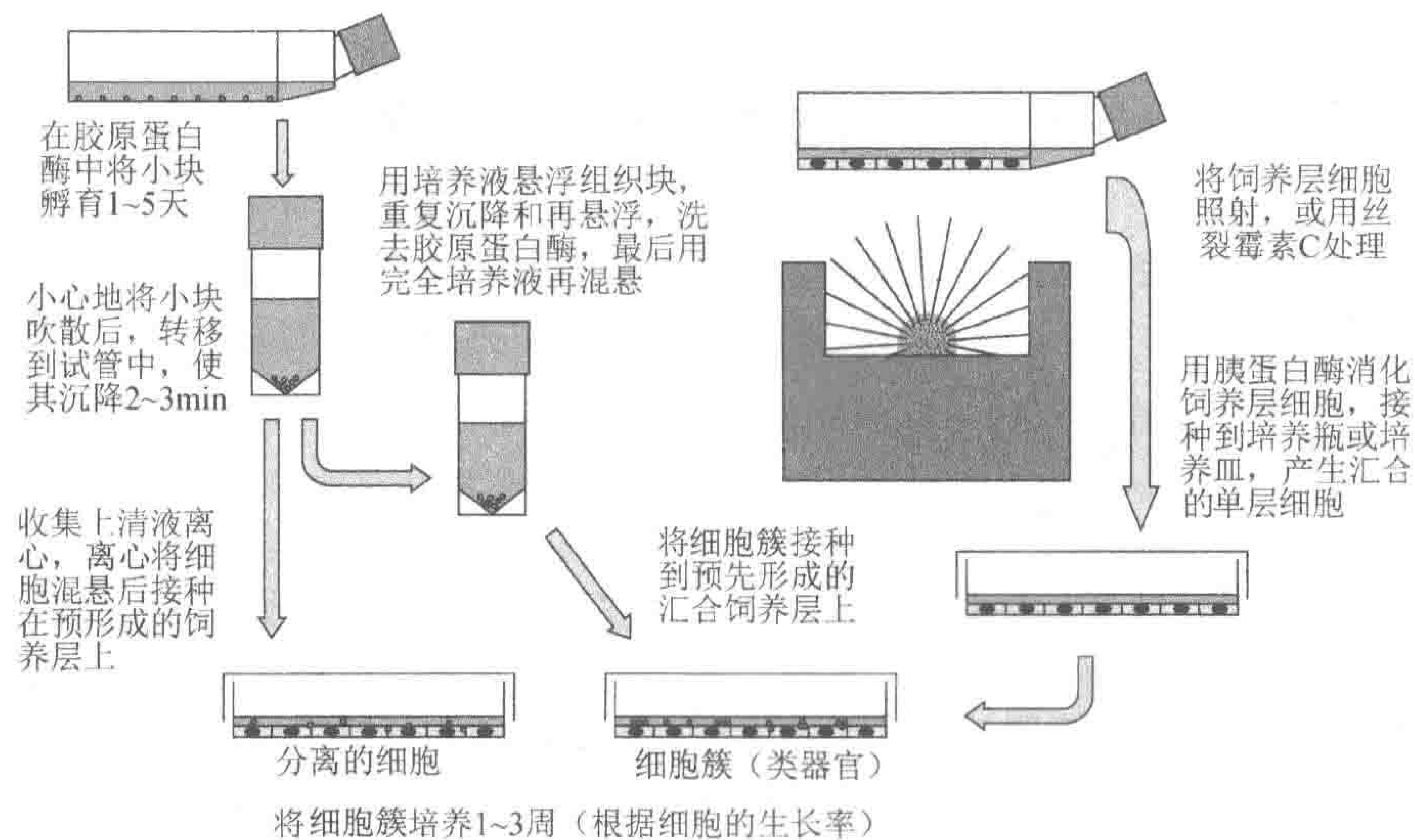


图 25.9 汇合的饲养层。通过高密度接种细胞或使在正常情况下出现接触抑制的细胞生长至汇合，以此制备汇合的饲养层。用胶原蛋白酶消化获得的上皮细胞簇能在汇合的饲养层如接触抑制的胎儿肠上皮（FHS74Int，见图 25.10；彩版 6c、d）、照射的 3T3 或 STO 细胞（参见 16.2.3 节和 25.13.2 节）上形成上皮细胞克隆。分离的细胞虽然含有较多的间质细胞，但通过有效地抑制间质细胞过度生长也能够在汇合的饲养层上形成克隆。选择性抑制是针对间质细胞，不影响正常上皮细胞生长

彩版6

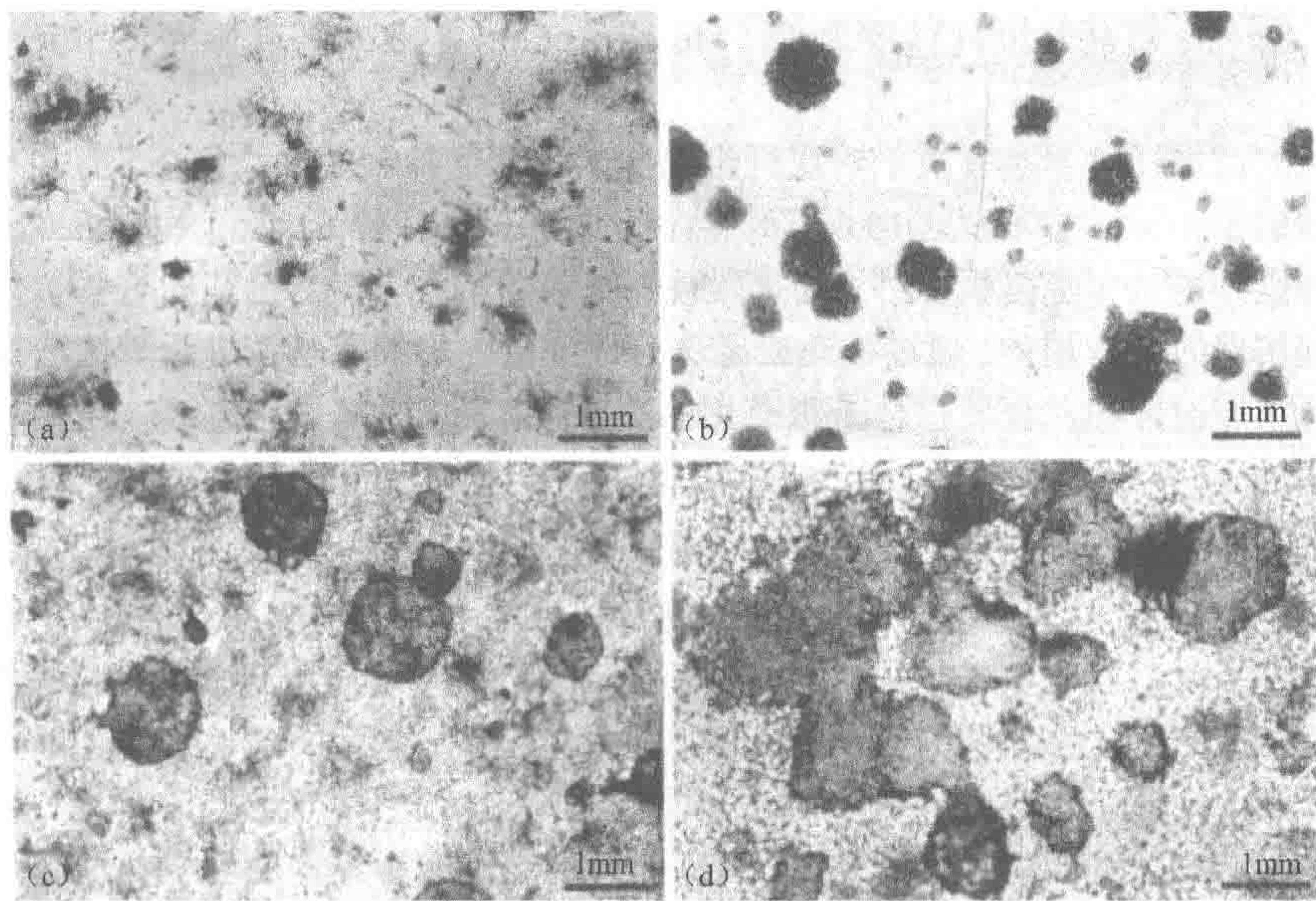


图 25.10 选择性饲养层。在汇合的饲养层上选择乳腺上皮细胞克隆。(a) 乳腺癌细胞按 4000 个/cm^2（2×10^4 个/mL）接种后单独在塑料上形成集落。小的、密集的集落是上皮细胞，较大的星形集落是成纤维细胞；(b) 来自同一个培养物的细胞集落，按 400 个/cm^2（2000 个/mL）细胞接种在汇合的 FHS74Int 细胞饲养层上（Owens et al.，1974）。上皮细胞集落比 (a) 中的更大，平板效应更高，并且没有成纤维细胞集落；(c) 来自不同乳腺癌细胞培养物的集落接种到同样的饲养层上。注意不同的集落形态有一个染色较浅的中心和在与饲养层相互作用点处的环；(d) 来自正常乳腺细胞培养的集落接种到 FHI 细胞上（人胎儿肠上皮；类似于 FHS74Int）。很少小的成纤维样细胞集落在 (c) 和 (d) 中出现（实验基于 Smith et al.，1981；A. J. Hackett，私人通信）（彩版 6c、d）

方案 25.28　在汇合的饲养层上培养

概要


彩版 1


彩版 15

用丝裂霉素 C 处理处于指数生长中期的饲养层细胞，再接种后让细胞生长形成汇合的单层。通过胶原蛋白酶消化从活检标本分离肿瘤细胞，或者用胰蛋白酶消化从原代培养物获得肿瘤细胞，然后将肿瘤细胞接种到汇合的单层上（图 25.9、图 25.10）。上皮性肿瘤细胞可以在 3 周至 3 个月内形成克隆。纤维肉瘤和神经胶质瘤细胞并不总是形成克隆，这些细胞可侵入饲养层，并逐渐地过度生长（彩版 1d、彩版 15b）。

材料

无菌

- 饲养层细胞（如 3T3、STO、10T1/2 或 FHS74Int）
- 1mg/mL 丝裂霉素 C（Sigma）

注意事项　首次使用饲养层细胞时，最好作丝裂霉素 C 的剂量反应曲线（参见方案 24.3），证实丝裂霉素 C 剂量能使饲养层细胞存活 2~3 周，但使细胞最多进行两个倍增后不再继续增殖，即至少不抑制克隆形成。通常是 0.25μg/mL 丝裂霉素 C 处理过夜或 20μg/mL 处理 1h。

- 生长培养液
- 2000U/mL 胶原蛋白酶，CLS 级（Worthington）或相当级别
- 0.25%胰蛋白酶，用 PBSA 配制
- 肿瘤活检标本或原代培养物
- 细弯镊
- 装有 22 号刀片的手术刀
- Petri 培养皿，用于解剖，同原代培养

操作步骤

1. 在 6 个 $75cm^2$ 培养瓶中，将饲养层细胞培养至 80%汇合。
2. 加入丝裂霉素 C 至合适的终浓度，一般约为 0.25μg/mL。
3. 用丝裂霉素 C 孵育细胞过夜（约 18h）。
4. 移出含丝裂霉素 C 的培养液，用新鲜培养液清洗细胞单层。
5. 将细胞进一步培养 24~48h。
6. 用胰蛋白酶消化细胞，以 5×10^5 个/mL（1×10^5 个/cm^2）的密度将细胞再接种到 $25cm^2$ 培养瓶中。将细胞培养 24h。
7. 如果使用活检标本，需在本操作步骤 2 将标本切开，放入胶原蛋白酶中（参见方案 11.9）。
8. 通过反复沉降或离心从分离的肿瘤细胞中移去胶原蛋白酶（参见方案 11.9）。
9. 将肿瘤细胞混悬，以 20~100mg/瓶接种到两个 $25cm^2$ 培养瓶中，每瓶含 6mL 细胞悬液。
10. 从每个培养瓶中取出 1mL 悬液，分别放入另外两个培养瓶中，加培养液至 4mL。
11. 第 3 对培养瓶作为对照，检查丝裂霉素 C 处理后饲养层细胞的存活能力。


彩版 15


彩版 1

如果使用从肿瘤活检标本获得的原代细胞，用胰蛋白酶消化或用终浓度为 200U/mL 胶原蛋白酶分离细胞（参见方案 11.9），将细胞接种到饲养层上，两个培养瓶的接种密度为 10^5 个/mL，另两个培养瓶中的细胞密度为 10^4 个/mL。如果细胞取自神经胶质瘤（彩版 15b）或纤维肉瘤（彩版 1d），由于肿瘤细胞在饲养层内自由迁移，可能不出现克隆。此时只能在无饲养层的条件下，将这些细胞传代后证实存活的肿瘤细胞（通过多次传代污染的间质细胞应当被除去）。

必须证实用这种方法获得的任何细胞系的来源，以防止来自饲养层内生长未受抑制细胞的意外污染。如果饲养层细胞与原代细胞不是同种细胞，细胞来源可通过染色体分析（参见方案 13.4）、乳酸脱氢酶同工酶电泳（参见方案 13.3）或细胞色素氧化酶基因内多态性（Cooper et al.，2007；见方案 13.2）证实。如果使用与原代细胞同种类的饲养细胞，需要对饲养层细胞和所产生的任何培养细胞作 DNA 图谱（参见方案 13.1）检测，然后用一部分活检标本或取自供者的其他组织比较这些结果。

25.13.3 悬浮克隆

细胞在体外的转化导致这些细胞在琼脂内形成克隆增多（参见 16.3 节和 22.4.1 节）。也有人提出致瘤性与在甲基纤维素内克隆形成相关（Freedman and Shin，1974）（参见 16.5 节）。由于在悬浮状态下可直接从去聚集的肿瘤细胞克隆细胞（Hamburger and Salmon，1977），或者至少可以生长成集落（Colonies）[它们可能不是克隆（Clones）] 它们的长势优于正常基质细胞，故悬浮克隆似乎是一项有潜在应用价值的选择培养技术。然而，这种克隆形成的效率很低（通常<0.1%），也不容易对从克隆分离的细胞进行扩增。虽然这种方法未用于建立细胞系，但已用于对肿瘤活检标本进行药物筛选（参见 24.4.2 节）。根据 Sca-1、Kit（Takahashi et al.，2004）和 ABC 转运蛋白（Zhou et al.，2001）（表 26.1）等干细胞标记物的表达，可用流式细胞仪或免疫磁珠分选阳性的克隆形成细胞，并且可根据更多的分化谱系标记物作阴性分选，由此可获得丰富而纯化的干细胞，这可能成为药物筛选和分子药物靶向治疗的良好靶点。

25.13.4 异种移植

当培养材料来源于人的肿瘤时，材料缺乏和很少再次活检意味着难以对同一肿瘤进行多次培养的尝试。某些肿瘤在免疫缺陷动物（Rofstad，1994）体内的生长提供了产生大量合适肿瘤的替代方法。由于正常情况下人间质成分并不生长，而是由鼠的间质组织替代，这也有利于筛选和肿瘤细胞扩增。有时发现，与亲本活检标本相比，更容易从异种移植肿瘤进行分离和培养，且没有基质细胞过度生长的倾向，但这是否是由较多组织的可利用性、转化细胞的富集、肿瘤的侵袭性或通过异种宿主引起的肿瘤细胞变更（如通过小鼠的反转录病毒）还不清楚。

目前使用的宿主有两种主要类型：T 细胞缺陷的遗传性去胸腺裸小鼠（Giovanella et al.，1974）和出生时切除胸腺并随后用射线照射及用胞嘧啶阿拉伯糖苷处理的新生动物（Selby et al.，1980；Fergusson et al.，1980）。第一种宿主的购买价格昂贵并难以饲养，但能使肿瘤生长维持较长时间。切除胸腺的动物准备较麻烦，但价格便宜，容易大量供应。然而，这些动物能在几个月后恢复免疫能力和最终排斥肿瘤。使用先天性无脾和去胸腺小鼠（如严重联合免疫缺陷鼠），或者使用经脾切除术或低剂量射线照射的裸小鼠可以增强肿瘤的移植率。另外，有人报道植入成纤维细胞或 Matrigel 可改善肿瘤移植（Topley et al.，1993）。

如果有足够的免疫缺陷裸小鼠，应该把异种移植看作制备培养材料的第一步。尽管仅有少部

分肿瘤可以移植，但移植的肿瘤或许更容易培养。通过随后在小鼠体内进行肿瘤传代可以进行重复培养的尝试。但是，如同从小鼠的饲养层分离一样必须特别小心，可通过适当的 DNA 图谱（参见 13.1.6 节）、染色体分析（参见 13.1.8 节）和同工酶鉴定（参见 13.1.7 节），以确保最终存活的细胞系是人的而不是小鼠的。

25.14 细胞系的建立

25.14.1 原代肿瘤培养物的传代

原代培养的癌细胞有时不容易用胰蛋白酶消化传代。由于遗传或表型的变异、最终分化或营养不足，许多原代培养的癌细胞不能扩增。然而，有些原代肿瘤细胞可以传代，这为肿瘤细胞的扩增开阔了前景。肿瘤细胞传代培养的结果表明，肿瘤细胞即使比污染的正常细胞生长快，也已不再处于过度生长状态，可用于进行克隆培养或其他选择性培养（参见 9.2 节、16.6 节和 25.13 节）。

传代培养的主要优点之一是扩增。扩增的细胞可冻存，反复培养用于细胞特性和特异性参数的分析，如遗传改变及基因表达和代谢途径分析、化学敏感性和侵袭性的变化。传代培养的缺点包括使肿瘤细胞表型变异，这是由肿瘤细胞内在的遗传不稳定性和细胞系对培养环境的选择适应性所致。

25.14.2 连续细胞系

培养的细胞是否来自肿瘤的主要标准之一是能够形成连续细胞系（图 18.2k~n，aa~ff，彩版 9）。这种细胞系的构成细胞通常是非整倍体、异倍体、对生长密度限定敏感、非依赖性贴壁生长且通常具有成瘤性（参见 22.4 节和 22.5 节）。然而，由于这种细胞并不总是典型的肿瘤细胞，连续细胞系与原代肿瘤细胞和原有肿瘤的关系还难以估计。连续细胞系的细胞可以表现为：①进一步转化，这是由肿瘤细胞不稳定的遗传学特征和适应性培养刺激所致；②肿瘤的特殊亚群或干细胞。近来认为，肿瘤干细胞的可能性似乎更大（Petersen et al.，2003），因为连续细胞系常常来自单层培养的克隆。这提示连续细胞系来源肿瘤细胞的一个较小永生性亚群，细胞培养仅为这些细胞的扩增提供适宜的条件。


彩版 9

形成连续细胞系的能力是恶性肿瘤起源的有用标准。有些作者坚持，细胞系的特征如成瘤性、组织学和化学敏感性等仍与肿瘤的起源有关（Tveit and Pihl，1981）。尽管这些细胞的演变需要时间，立即用于临床研究较困难，但无论如何这些细胞系提供了有用的实验材料。Masters 和 Palsson（1999～2000）在系列丛书中对癌细胞系做了综述。

连续细胞系状态的维持还不确定，但它们为分子和病毒学研究提供了一种有价值的人类细胞系来源。问题是这些连续细胞系是否代表一种肿瘤形成的进展阶段，还是这种肿瘤在培养中已有所演进，成为一种隐藏的干细胞，或者纯粹是体外的一种人工假象还有待于解决。连续细胞系的确不同于大多数早期的肿瘤细胞，但它们可能还含有从中获得的亲本细胞基因型的某些有意义的成分。这些连续细胞系的永生性与其说是赋予本来恶性化基因的过表达，更像是由于诱导衰老的基因缺失或抑制（Pereira-Smith and Smith，1988；Goldstein et al.，1989；Holt et al.，1996；Sasaki et al.，1996）及已增高的端粒酶活性（Bryan and Reddel，1997；Bodnar et al.，1998）。

25.15 肿瘤细胞培养物的特征

25.15.1 肿瘤细胞的异质性

从肿瘤分离细胞可以产生几种不同类型的细胞系。除肿瘤细胞、结缔组织的成纤维细胞、血管的内皮细胞和平滑肌细胞外，浸润的淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞及形成肿瘤的正常组织成分都能移植存活。尽管已从小细胞肺癌获得造血细胞系，但造血细胞很少形成细胞系。由于小细胞肺癌也趋向于产生表达骨髓细胞标记的悬浮培养细胞，这引起了严重的混淆（Ruff and Pert，1984）。巨噬细胞和粒细胞的黏附力强且不增殖，以致通常在传代时消失。如果没有合适的生长因子和选择培养液，平滑肌细胞不容易扩增，故培养肿瘤细胞的主要潜在污染细胞是成纤维细胞、内皮细胞和肿瘤细胞的正常等同细胞。

细胞污染的主要问题在于成纤维细胞，这些细胞在培养时容易生长，并可对肿瘤源性细胞分裂因子发生反应。同样，内皮细胞可对肿瘤源性血管形成因子发生反应并容易增殖，尤其是在缺少成纤维细胞时。由于用合适实验不易分析正常等同细胞与肿瘤细胞的相似性，故正常等同细胞的作用难以确定。应当选择特征性标准排除非肿瘤细胞。例如，内皮细胞呈第Ⅷ因子阳性、接触抑制和对生长密度限定敏感。成纤维细胞具有特征性梭状形态和生长密度限定，虽然这种限定远远小于内皮细胞。成纤维细胞有约50代的限定寿命，产生Ⅰ型胶原蛋白。严格地说，成纤维细胞为二倍体细胞。

一般来说，很难鉴定和排除在表型上与肿瘤细胞等同的正常细胞。正常细胞都是二倍体细胞，尽管有些肿瘤细胞或许接近二倍体。正常细胞通常是贴壁生长，有一定的寿命，然而也有几个正常上皮细胞系可以变为连续细胞系（Boukamp et al.，1988）。如果这些细胞属于上皮细胞，很有可能受到血清中 TGF-β 的抑制。肿瘤细胞很可能表现遗传变型，如癌基因的扩增和转位及抑制基因缺失，这些可通过 FISH 或 PCR 法进行鉴定。肿瘤细胞也可能有血管形成作用（参见 22.5.4 节），高表达尿激酶样纤溶酶原活化物（uPA）（参见 22.5.5 节），并且具有侵袭性（参见 22.5.3 节）。

用于鉴定培养中肿瘤细胞的一般特征已在第 22 章叙述过（参见 22.4 节和 22.5 节，表 22.1）。尽管这些特征常表现在连续细胞系中，但由于培养的早期几代细胞具有较高的异质性，可能较难检测出这些特征。需要检测特异的基因异常，最好通过原位分析（如 Keith，2003；Malvestiti，2009）。同样，可用细胞免疫染色或流式细胞术检测高表达的原癌基因产物（如突变的 *p53*）或 *erb-B*。

如果出现一个新的细胞系，最基本的检测方法是显示这个细胞系 DNA 表达谱与供者（来自保留的血液或组织）DNA 相匹配，并且可与实验室中同时培养的任何其他连续细胞系进行鉴别（参见 13.1 节）。

从行为方面来讲，肿瘤细胞能够在预先形成的同种正常细胞单层上生长，此是鉴定肿瘤细胞的良好标准，并且是潜在的分离模型。正常细胞也为维持肿瘤细胞的生长提供饲养层。例如，神经胶质瘤细胞很容易在预先形成的正常胶质细胞单层上生长，某些情况下优于在塑料上生长（MacDonald et al.，1985）。但是，神经胶质瘤细胞的正常相似物不能在胶质细胞单层上生长。同样，肝癌细胞能在正常肝细胞上生长，皮肤癌细胞能在正常表皮角质细胞上生长，乳腺癌细胞能在正常乳腺上皮细胞上生长。

在达到饱和密度时，正常细胞的生长指数趋向减慢（参见 22.4 节和 23.11.1 节），而肿瘤细胞在汇合后仍继续快速地生长。有时，将肿瘤细胞维持在高密度条件下可为细胞提供过度生长的

条件（参见 20.3.9 节和方案 22.3）。

25.15.2 组织型培养

除器官培养（20.2 节）本身的肿瘤组织与正常组织没有根本的差别外，特殊用于肿瘤培养的组织型培养法是球体培养（参见方案 20.2）和滤池培养（参见方案 20.3）。

球体形成 正常间质细胞不形成球体或者可参与到肿瘤源性球体中。因此，能够在非黏附的底物如琼脂上（参见方案 20.2）形成球体的肿瘤细胞具有在间质细胞上过度生长的趋向。有些乳腺癌和小细胞肺癌的肿瘤细胞能够形成漂浮的球体或不规则的细胞类器官。可从培养上清液中收集这些球体或细胞类器官，保留下面的间质细胞。然而，细胞球体或类器官并非总是在培养后立即出现，有时可能需要数周甚至数月才能形成，这提示来自肿瘤内的极少数细胞。在其他情况如乳腺癌，三维类器官可表现为正常上皮结构（Speirs，2004）。球体形成并不是发生在所有培养的肿瘤细胞，但在神经母细胞瘤、黑色素瘤和神经胶质瘤的细胞已有记载（参见 20.3.3 节）。

滤膜小皿插件 滤膜小皿插件的设计是为了重建细胞来源组织内的细胞与基质的相互作用。因此，滤膜小皿插件为研究肿瘤侵袭（参见 22.5.3 节）、血管新生（参见 22.5.4 节）和其他异常的细胞相互作用提供了理想模型。

25.16 特殊类型肿瘤

第 11 章中叙述的一般实验步骤（参见方案 11.3~方案 11.11）和选择性培养技术（参见 24.13 节和 25.1 节）可为培养大多数类型肿瘤提供良好的开端。一般来说，一种合理的肿瘤培养方法是将胶原蛋白酶消化（如方案 11.9），与本章实验方案中描述的组织特异性方法相结合，使用或不使用饲养层。虽然无血清条件对于正常组织的细胞有选择性，但肿瘤细胞对营养和生长因子的需求变化较大（参见 25.13 节），需使用血清。下面对某些特殊的肿瘤培养事例进行简要的讨论。

25.16.1 乳腺

乳腺癌细胞可通过胶原蛋白酶消化活检组织进行培养（Leake et al.，1987；Dairkee et al.，1995，1997；Speirs，2004）（图 25.11），并且可在饲养层上或 MCDB 170 培养液中扩增。然而，许多用于培养正常乳腺细胞的条件（添加生长因子和用胶原蛋白预涂培养皿）可能对于乳腺癌细胞培养不理想（Ethier et al.，1993），因此需要尝试不同条件，并确认培养的细胞具有肿瘤细胞特性。

鉴定乳腺肿瘤细胞以区别正常乳腺细胞，需要检测特异基因 *erbB-2*、*c-myc* 和成纤维细胞生长因子受体 2（FGFR2）的异常（Ethier et al.，1993；Ray et al.，2004；Yu et al.，2014），以及细胞周期素 E 水平升高（Willmarth et al.，2004）。能够用细胞角蛋白和 EMA（Brozova et al.，2007）鉴定上皮谱系。然而，实际上没有肿瘤特异性上皮标记物。有人提出，肿瘤细胞在体外很可能表达角蛋白 19，而正常乳腺细胞不表达（Taylor-Papadimitriou et al.，1989）。

乳腺肿瘤细胞培养方案 25.29-Su 见本章的补充材料。

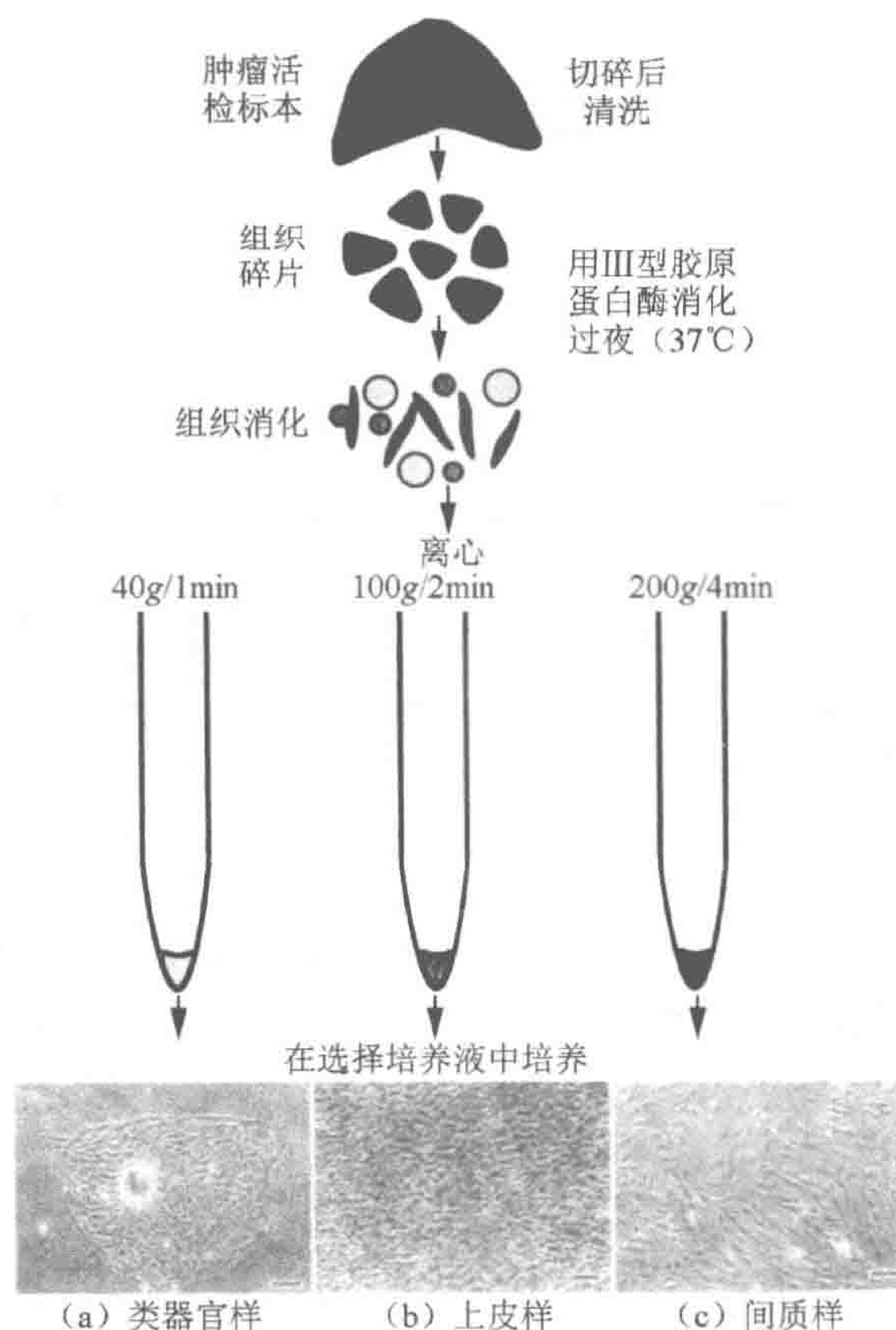


图 25.11 乳腺癌的消化分离。通过差速离心方法可将上皮细胞簇、分散的上皮细胞和基质细胞悬液分成为几个组分，分别在低速离心、中速离心和高速离心时分离获得（参见方案 25.29-Su，方案 25.3-Su 和图 25.1）（摘自 Speirs，2004）

25.16.2 肺

使用无血清选择培养基，采用机械性剥落和 Ficoll 密度梯度离心法分离细胞，已成功地培养了小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（NSCLC）的细胞（Oie et al.，1996；方案见 Wu，2004）。用于 SCLC 培养的无血清选择培养基为 HITES，而用于 NSCLC 培养的无血清选择培养基为 ACL4。这些细胞系大部分已被 NCI 收录，有些可与 ATCC 联系。有人研究了基质在癌基因和生长因子表达方面的作用（Pavelic et al.，1992），并已将基质用于促进骨髓微转移肺癌细胞的培养（Pantel et al.，1995）。选择培养基已用于检测短期培养中的血管形成趋向（Heinzman et al.，2008）。体外检测化疗药物对肺癌在脑内转移瘤作用的结果表明，疗效具有异质性（Marsh et al.，2004）。

许多标记物可用于体外鉴定 SCLC 细胞，如检测铃蟾肽样免疫反应，以及 DOPA-脱羧酶、N-*myc* 和肌酸激酶 BB 同工酶的高表达（Carney et al.，1985；Pedersen et al.，2003），但变异的 SCLC 和 NSCLC 细胞缺乏这些标记物。已有研究表明，鳞状细胞肺癌高表达 EGFR、*erb*B-2 和 TGF-α（Piyathilake et al.，2002）。其他 NSCLC 细胞系在体外表达异常，如 HER2/neu、TP53 和 K-ras 的表达，这些标记物的表达与来源肿瘤在体内的表型有关（Wistuba et al.，1999）。

25.16.3　胃

用手术剪将胃癌剪成碎片，然后用吸管吹打，这样能够从固体胃癌组织的纤维基质中分离出肿瘤细胞。腹水中的肿瘤细胞可用 Ficoll 甲基泛影离心分离（方案见 Park et al.，2004）。通过机械性收集和传代（刮除成纤维细胞或用胰蛋白酶消化）可获得丰富的肿瘤细胞。获得的细胞系的形态不同，包括扁平的铺路石样单层、折光较强的卵石状单层或疏松的细胞簇（图 25.12）。

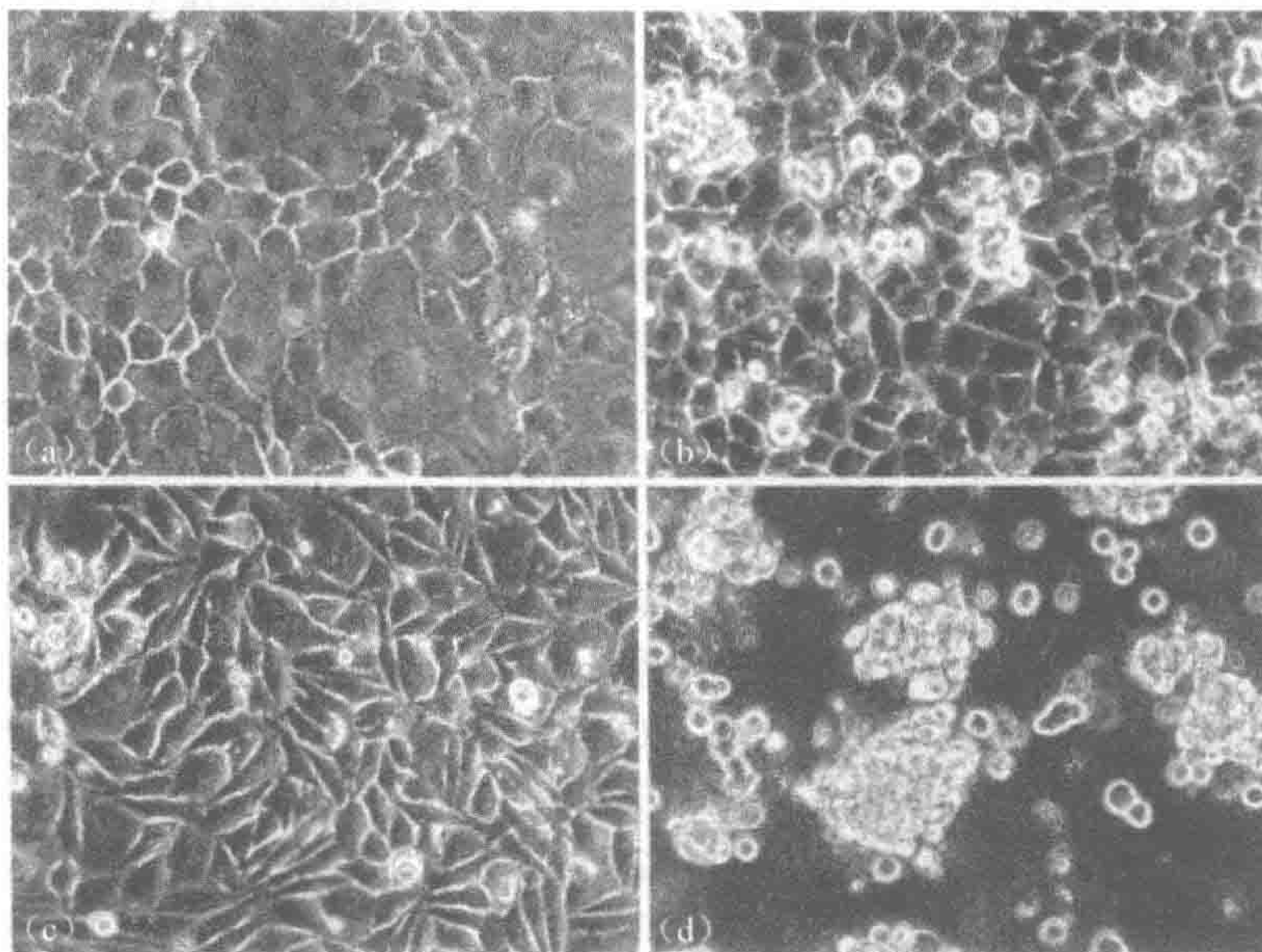


图 25.12　胃癌细胞系。（a）很扁平的 SNU-216 胃癌细胞系单层；（b）铺路石样 SNU-484 胃癌细胞系单层；（c）折光较强的卵石状 SNU-688 胃癌细胞系。癌细胞贴壁、扩散铺展生长，细胞呈梭形或多角形；（d）SNU-620 胃癌细胞系。癌细胞以贴壁形式和悬浮细胞簇形式生长。引自 Park 等（2004）

25.16.4　结肠

有人叙述了培养一些人结肠直肠癌细胞系的无血清培养条件（Murakami and Masui，1980；Fantini et al.，1987），但这些条件一般不适合于培养刚分离出的癌细胞，这些细胞的培养需要血清。有人培养过取自原发性肿瘤和转移瘤（Danielson et al.，1992；Paraskeva and Williams，1992；Park and Gazdar，1996）活检标本的结肠直肠癌细胞，并且已用作研究上皮间质转化调控的模型（Vincan et al.，2008）。如同肺癌一样，某些结肠直肠肿瘤表现出具有神经内分泌特征。已有报道，用 HITES 培养基（表 9.2）培养结肠直肠肿瘤细胞（Lundqvist et al.，1991）取得了一些成功。Percoll 密度离心法已用于在常规培养液（含 10% FBS 的 RPMI1640）中纯化原代培养的集落结肠癌细胞（Csoka et al.，1995）。

结直肠肿瘤细胞的培养方案 25.30-Su 见本章的补充材料。

培养结肠癌细胞的方案也可见 Whitehead（2004）。方案 25.30-Su 是 Paraskeva 和 Williams（1992）提供的。

25.16.5 胰腺

已从胰腺原发性肿瘤或转移瘤分离了细胞系，并用添加胎牛血清的RPMI1640进行了扩增（参见方案25.8-Su）。这些细胞系适合于无蛋白培养基培养，用于检测细胞产物（Yamaguchi et al.，1990）。另外，已将胰腺癌细胞培养用于研究染色木黄酮在血管新生方面的作用（Buchler et al.，2004）。

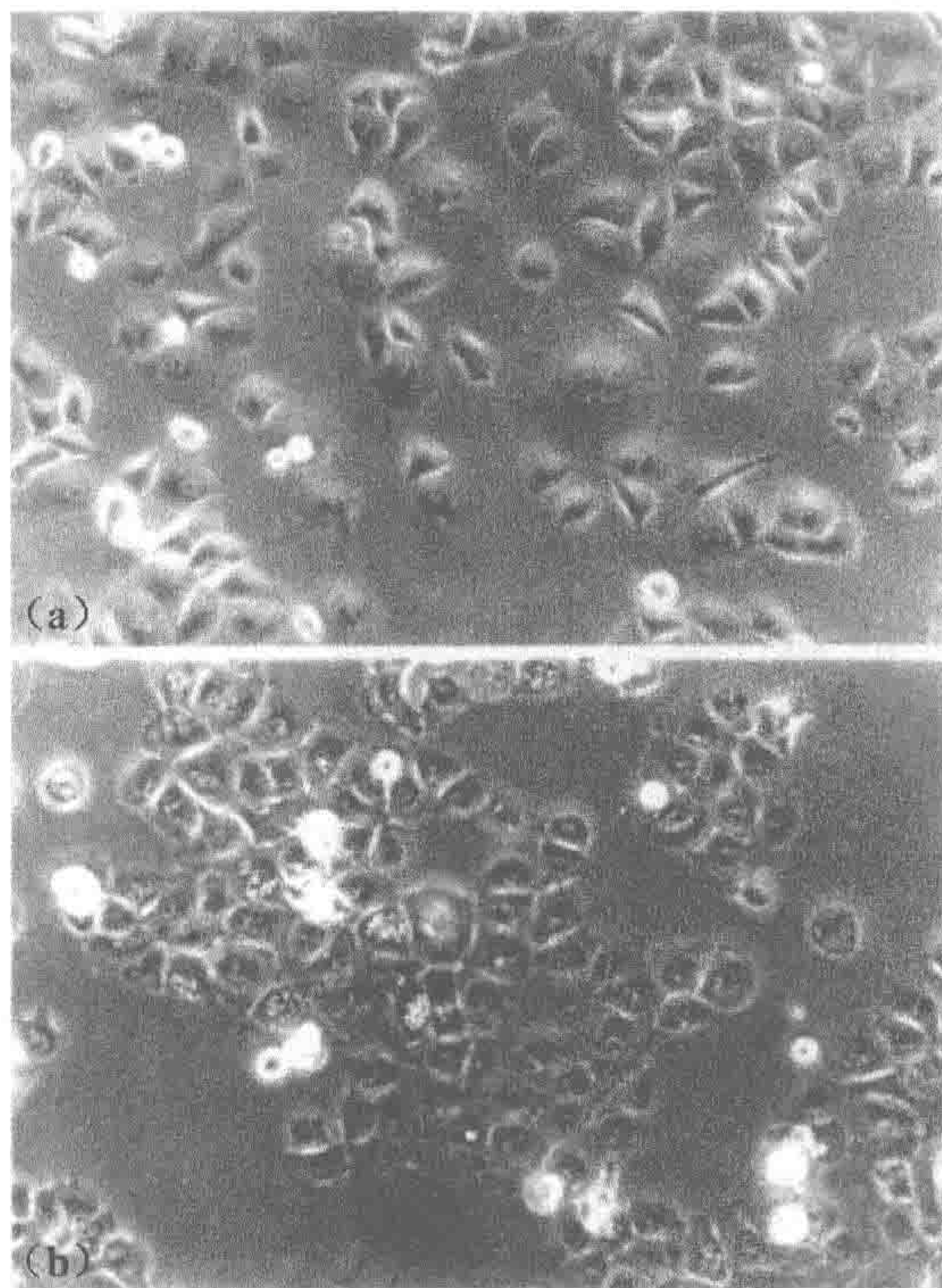


图25.13 胰腺癌细胞系。在裸小鼠异种移植后从肝转移瘤建立的细胞系KP-1N（a）和KP-3（b）的显微镜照片。相差显微镜125×。引自Iguchi等（2004）

有人为研究胃泌素的自分泌生长调控建立了胰腺细胞系（Monstein et al.，2001），但未检测到胃泌素与胆囊收缩素（CCK）受体的表达之间存在联系。正常情况下，胃泌素与胆囊收缩素受体结合。KCI-MOH1是一种克隆的胰腺癌细胞系，经在SCID小鼠传代建立（Mohammad et al.，1999）。异种移植的肿瘤也可用于建立HPAC细胞系，以研究糖皮质激素受体（Gower et al.，1994）。除在Matrigel涂的滤池嵌套中研究增殖、迁移和侵袭外，通过与胰腺癌的基质细胞共培养可促进异种移植的生长和在软琼脂中的克隆（Hwang et al.，2008）。用胶原蛋白酶消化和种植于胶原蛋白预涂的培养皿的胰腺癌细胞培养方案可见Iguchi等（2004），他们从原发肿瘤、腹水和肝转移瘤建立了细胞系。通过在裸小鼠脾注射进行传代从肝转移瘤建立了两个细胞系（图25.13）。

25.16.6 卵巢

已从卵巢上皮性肿瘤建立了多个细胞系，如OAW系列（Wilson et al.，1996）、OVCAR-3（Hamilton et al.，1983）和A2780（Tsuruo et al.，1986），有些细胞系使用无血清培养基（Jozan et al.，1992），而另一些细胞系使用含有血清的培养基，如胶原蛋白酶消化后使用添加15% FBS的OSE培养基和M199/MCDB 105（50∶50）（Lounis et al.，1994）。从腹水或胸膜腔渗出液分离肿瘤细胞似乎比从固体性肿瘤材料分离容易（Verschraegen et al.，2003）。另外，如同结肠癌，Percoll密度离心法也用于纯化原代培养的卵巢癌细胞（Csoka et al.，1995）。卵巢癌细胞培养的方案可见Wilson（2004）。

25.16.7 前列腺

如同上述的肺癌细胞培养，基质辅助法也已成功地用于从前列腺肿瘤分离细胞系（Pantel et al.，1995）。无血清培养也可用于正常前列腺，以及良性和恶性肿瘤来源的细胞培养（Chopra et al.，1996；Peehl，2002；Bright and Lewis，2004）（参见方案25.11-Su）。通过构建编码E6和E7的

HPV16 转化蛋白的反转录病毒，使细胞永生，可作长期培养（Bright and Lewis，2004）。已建立的 21 例前列腺癌细胞系中 17 例的分子特征是真实的（Van Bokhoven et al.，2003）。用其中之一细胞系 PC3 和人骨髓内皮细胞作材料，已证明地塞米松可抑制血管新生并增强多西塔塞（docetaxel）的抗血管形成特性（Wilson et al.，2008）。

已知前列腺上皮的发育受基质 FGF 家族生长因子如 KGF 的旁分泌调控（Thomson et al.，1997）。从正常前列腺、良性前列腺肿瘤（BPH）和前列腺癌分离培养细胞时，观察到 BPH 的 FGF-17 增加两倍（Polnaszek et al.，2004）。另外，有人研究了正常前列腺和前列腺肿瘤的细胞通过一氧化氮（Wang et al.，2003）和 VEGF 信号（Shih et al.，2003）促进肿瘤血管新生的作用。

25.16.8 膀胱

在膀胱癌细胞的培养方面，表浅肿瘤细胞的寿命有限，而侵袭肌层肿瘤的细胞系常形成连续细胞系（Yeager et al.，1998）。已有人将移行细胞膀胱癌的原代细胞用于研究 FasL 对于膀胱癌细胞的免疫保护作用（Chopin et al.，2003），并且描述了一种通过添加甘油培养方法使得低分化表浅膀胱上皮癌细胞的培养成功率由 63%提高到 86%（Seifert et al.，2007）。膀胱癌细胞的培养方案可见 Fu 等（2004）。

25.16.9 皮肤

黑色素瘤 能够用合适的生长因子培养皮肤的黑素细胞（参见方案 25.21-Su），也能够较成功地分离培养黑色素瘤细胞（Creasey et al.，1979；Mather and Sato，1979a，1979b）。原代黑色素瘤细胞常被成纤维细胞污染，但有可能在汇合的正常细胞饲养层上进行克隆（参见方案 25.28）（Creasey et al.，1979；Freshney et al.，1982）。对于用机械性剥离技术分离的细胞，用 100μg/mL 遗传霉素（G418）处理可除去成纤维细胞（Halaban，2004）。

添加 FGF-2、胰岛素、转铁蛋白、α-生育酚、牛脑垂体提取物、氢化可的松和 5%血清的 MCDB 153 已用于培养正常皮肤、发育不良性痣和转移性黑色素瘤的黑素细胞（Levin et al.，1995）。在第 1、2 代细胞培养添加过氧化氢酶和 PMA。有人报道了一种研究黑色素瘤细胞与角质形成细胞相互关系的器官性系统（Santiago-Walker et al.，2009）。黑色素瘤细胞的培养方案见 Halaban（2004）。

基底细胞癌 皮肤的基底细胞癌（BCC）对于人类来说是最常见的一种癌，主要由 *SONIC HEDGEHOG* 基因激活引起，突变抑制基因 *PATCHED* 在此通路中的作用已在皮肤等同的器官型培养中进行了研究（Brellier et al.，2008）。3T3 细胞饲养层技术成功地用于培养皮肤 BCC（Rheinwald and Beckett，1981）（参见方案 25.1-Su）。Oh 等（2003）利用 BCC 的原代细胞研究了血管形成潜力，观察到肿瘤生长与侵袭相关。已有研究表明，与正常的角质形成细胞相比，BCC 的细胞对于干扰素的细胞毒性更敏感（Brysk et al.，1992）。

鳞状细胞癌（SCC） 有人在 3T3 饲养层上培养过 SCC 和黏膜红斑的细胞（方案见 Edington et al.，2004），已建立了具有价值的、呈现不同恶性和永生程度的细胞系（BICR 系列）（Fitzsimmons et al.，2003；Gordon et al.，2003）。已将 HaCaT 细胞（Boukamp et al.，1988）用作 SCC 的一种模型，用或不用 Ras 转染。许多 SCC 是口腔的，并已显示其侵蚀性受附加物 A5 调控（Wehder et al.，2009）。

25.16.10 子宫颈


彩版1

利用正常子宫颈细胞培养的3T3饲养层技术，可对宫颈活检标本进行良性和恶性肿瘤细胞的培养（Stanley and Parkinson，1979）（参见方案25.4-Su，彩版1c）。已将细胞培养用于研究染色体不稳定性及人乳头瘤病毒的整合，提示乳头瘤病毒与子宫颈癌的发生有关（Koopman et al.，1999），与上皮间质转化有关（Lee et al.，2008）。

子宫颈癌细胞的培养方案可见Stern等（2004）。

25.16.11 胶质细胞瘤

用机械性分散、胰蛋白酶或胶原蛋白酶消化分离人神经胶质瘤细胞（Westermark et al.，1973；Pontén and Macintyre，1968；Freshney，1980；附加的方案见Darling，2004）。采用神经胶质瘤活检标本，用方案11.8（省略步骤12）在原代培养获得了80%、早期几代细胞系60%的高成功率（Freshney，1980）（图25.14；彩版7a~c和彩版9c）。接种到汇合的单层或正常神经胶质细胞上，早期几代人神经胶质瘤细胞可增殖，而正常神经胶质细胞不增殖（MacDonald et al.，1985），由此建立了一种从神经胶质瘤细胞去除正常神经胶质细胞的选择性方法。然而，大多数神经胶质瘤细胞会长出正常胶质细胞，尤其是如果生长到变为连续细胞系（Pontén and Macintyre，1968），这种情况常在没有任何征兆的情况下发生。


彩版7


彩版9

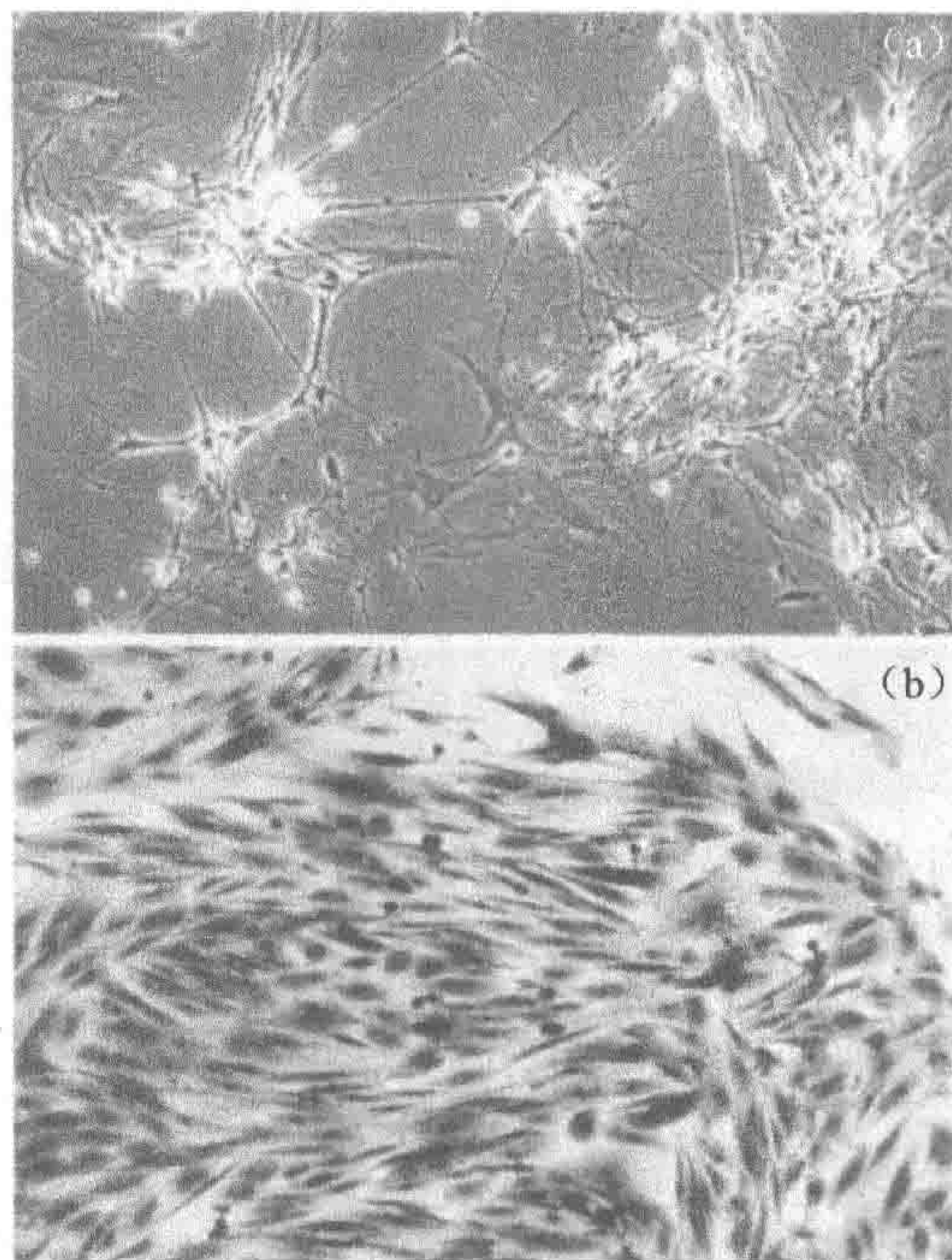


图25.14 人神经胶质瘤细胞。培养的两种人退行发育星形细胞瘤的细胞。(a) 用胶原蛋白酶消化分离的原代细胞，为典型的星形胶质细胞，可能是已分化的肿瘤细胞或反应性神经胶质细胞；(b) 连续细胞系MOG-G-UVW，呈现神经胶质瘤细胞系的几种形态之一。细胞呈多形的成纤维细胞样，无典型的多极星形胶质细胞，后者在连续细胞系中常丧失

有人已对啮齿动物的许多神经胶质瘤进行了细胞培养，特别是C6（Benda et al.，1968）。该细胞系中表达星形胶质细胞的标记物神经胶质原纤维酸性蛋白的细胞达98%（Freshney et al.，1980a），但仍含有甘油磷酸脱氢酶和2′,3′-环核苷酸磷酸化酶（Breen and de Vellis，1974），这两种酶是少突胶质细胞的标记物。该细胞系是前体细胞肿瘤可同时沿两条不同的表型途径成熟的有趣例证。

人神经胶质瘤细胞已用于预测性化学敏感性实验（Thomas et al.，1985）、糖皮质敏感性实验（Guner et al.，1997；Freshney，1980b），近来用于逆病毒介导疗法（Rainov and Ren，2003）和用脑肿瘤选择性肽配体与细胞毒素靶向融合（Liu et al.，2003）的研究。现已认为，在无血清培养基中单层培养与神经球培养结合有助于维持获得细胞系原本在体内的表型（Fael A1-Mayhani et al.，2009）。

25.16.12 神经母细胞瘤

由于神经母细胞瘤的分化潜力（Dimitroulakos et al.，1994），迄今已分离到数个神经母细胞瘤细胞系如 SK-N-BE（2）（Biedler and Spengler，1976；Tumilowicz et al.，1970），并认为这些细胞系具有特殊的意义。这是因为它们在神经毒素检测方面有潜在应用价值，虽然对毒素的反应与正常神经元仍有显著性差异。此外还发现，小鼠神经母细胞瘤细胞是可传染性海绵状脑病（TSE）细胞的合适培养底物（Solassol et al.，2003）。

25.16.13 精原细胞瘤

已用 STO 细胞作为饲养层培养睾丸精原细胞瘤细胞，如同培养胚胎干细胞（Olie et al.，1995）那样添加干细胞因子（SCF）、LIF 和 FGF-2。虽然培养的细胞是异质的，但不产生原始生殖细胞。

25.16.14 淋巴瘤和白血病

用常规方法难以从淋巴瘤和白血病细胞建立细胞系。许多现存的连续细胞系是由 Burkitt 淋巴瘤建立的（Drexler and Minowada，2000），携带融合的 EB 病毒基因。淋巴瘤和白血病细胞的培养方案可见 Drexler（2004）。

建立白血病/淋巴瘤连续细胞系方案 25.31-Su 见本章的补充材料。

参考文献

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**:43–47.

Anazawa T, Balamurugan AN, Bellin M, Zhang HJ, Matsumoto S, Yonekawa Y, Tanaka T, Loganathan G, Papas KK, Beilman GJ, Hering BJ, Sutherland DE (2009). Human islet isolation for autologous transplantation: comparison of yield and function using SERVA/Nordmark versus Roche enzymes. *Am. J. Transplant.* **9**:2383–2391.

Anderson JE, Wozniak AC (2004). Satellite cell activation on fibers: modeling events in vivo—an invited review. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**:300–310.

Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG (1979). Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature* **278**:364–365.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **34**:75–83.

Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, Yamazaki H, Yamane T, Panthier JJ, Kunisada T (2005). Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev. Dyn.* **233**:407–417.

Bard DR, Dickens MJ, Smith AU, Sarck JM (1972). Isolation of living cells from mature mammalian bone. *Nature* **236**:314–315.

Barnett SC (2004). Olfactory ensheathing cells: Unique glial cell types? *J. Neurotrauma* **21**:375–382.

Barnett SC, Chang L (2004). Olfactory ensheathing cells: Going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci.* **27**(1):54–60.

Barnett SC, Riddell JS (2004). Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury; advantages and possible caveats. *J. Anat.* **24**:57–67.

Barnett SC, Riddell JS (2007). Cell transplantation strategies for spinal cord repair: What can be achieved? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **3**:152–161.

Bedrin MS, Abolafia CM, Thompson JF (1997). Cytoskeletal association of epidermal growth factor receptor and associated signalling proteins is regulated by cell density in IEC-6 intestinal cells. *J. Cell. Physiol.* **172**:126–136.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**:370.

Benya PD, Padilla SR, Nimmi ME (1977). The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen type I and III and I trimer, but not type II: Verification by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry* **16**:865–872.

Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M, Taylor-Papadimitriou J (1992). Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: The role of the alpha 2 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **102**:437–446.

Bhagavati S, Xu W (2004). Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**:119–124.

Biedler JL, Spengler BA (1976). A novel chromosomal abnormality in human neuroblastoma and anti-folate resistant Chinese hamster cell lines in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**:683–695.

Blanco, FJ, Geng Y, Lotz M (1995). Differentiation dependent effects of IL-1 and TGF-β on human articular chondrocyte proliferation

are related to nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* **154**:4018–4026.

Blouin R, Grondin G, Beaudoin J, Arita Y, Daigle N, Talbot BG, Lebel D, Morisset J (1997). Establishment and immunocharacterization of an immortalized pancreatic cell line derived from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:717–726.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C-P, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**:349–352.

Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6368–6372.

Bolton BJ, Spurr NK (1996). B-lymphocytes. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 283–298.

Bosco D, Soriano JV, Chanson M, Meda P (1994). Heterogeneity and contact-dependent regulation of amylase release by individual acinar cells. *J. Cell. Physiol.* **160**:378–388.

Bossis I, Voutetakis A, Matyakhina L, Pack S, Abu-Asab M, Bourdeau I, Griffin KJ, Courcoutsakis N, Stergiopoulos S, Batista D, Tsokos M, Stratakis CA (2004). A pleiomorphic GH pituitary adenoma from a Carney complex patient displays universal allelic loss at the protein kinase A regulatory subunit 1A (PRKARIA) locus. *J. Med. Genet.* **41**:596–600.

Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, Borsotti C, Del Bo R, Fortunato F, Salani S, Quirici N, Bertolini F, Gobbi A, Deliliers GL, Pietro Comi G, Soligo D (2004). Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp. Cell Res.* **295**:66–78.

Boukamp P, Petrusevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A (1988). Normal keratinisation in a spontaneously immortalised, aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**:761–771.

Boyce ST, Ham RG (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**:33s–40s.

Braaten JT, Lee MJ, Schewk A, Mintz DH (1974). Removal of fibroblastoid cells from primary monolayer cultures of rat neonatal endocrine pancreas by sodium ethylmercurithiosalicylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**:476–482.

Breen GAM, De Vellis J (1974). Regulation of glycerol phosphate dehydrogenase by hydrocortisone in dissociated rat cerebral cell cultures. *Dev. Biol.* **41**:255–266.

Brellier F, Bergoglio V, Valin A, Barnay S, Chevallier-Lagente O, Vielh P, Spatz A, Gorry P, Avril MF, Magnaldo T (2008). Heterozygous mutations in the tumor suppressor gene PATCHED provoke basal cell carcinoma-like features in human organotypic skin cultures. *Oncogene* **27**:6601–6006.

Bretzel RG, Bonath K, Federlin K (1990). The evaluation of neutral density separation utilizing Ficoll, sodium diatrizoate and Nycodenz and centrifugal elutriation in the purification of bovine and canine islet preparations. *Hormone Metab. Res.* **25**(suppl.):57–63.

Bright RK, Lewis JD (2004). Long-term culture of normal and malignant human prostate epithelial cells. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*, Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 125–144.

Brockes JP, Fields KL, Raff MC (1979). Studies on cultured rat Schwann cells; I: Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* **165**:105–118.

Brower M, Carney DN, Oie HK, Gazdar AF, Minna JD (1986). Growth of cell lines and clinical specimens of human nonsmall cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.* **46**:798–806.

Brozova M, Kleibl Z, Netikova I, Sevcik J, Scholzova E, Brezinova J, Chaloupkova A, Vesely P, Dundr P, Zadinova M, Krasna L, Matouskova E (2007). Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res. Treat.* **103**(2):247–257.

Bryan TM, Reddel RR (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur. J. Cancer* **33**:767–773.

Brysk MM, Santschi CH, Bell T, Wagner RF Jr, Tyring SK, Rajaraman S (1992). Culture of basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **98**:45–49.

Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Lavey RS, Hines OJ (2004). Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression. *Cancer* **100**:201–210.

Buehring GC (1972). Culture of human mammary epithelial cells: Keeping abreast of a new method. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**:1433–1434.

Buonassisi V, Sato G, Cohen AI (1962). Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:1184–1190.

Burke JF, Price TNC, Mayne LV (1996). Immortalization of human astrocytes. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of immortalized cells*. New York Wiley-Liss, pp. 299–314.

Campion DG (1984). The muscle satellite cell—a review. *Int. Rev. Cytol.* **87**:225–251.

Cao D, Lin G, Westphale EM, Beyer EC, Steinberg TH (1997). Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signaling in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* **110**:497–504.

Carney DN, Bunn PA, Gazdar AF, Pagan JA, Minna JD (1981). Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3185–3189.

Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moodt TW, Zweig MH, Minna JD (1985): Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.* **45**: 2913–2923.

Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Rebelatto CL, Senegaglia AC, Hansen P, Mendonca JG, Cury CC, Francisco JC, Brofman PR (2004). Could the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells be a solution for postinfarction myocardial scar? *Transplant. Proc.* **36**:991–992.

Ceriani RL, Taylor-Papadimitriou J, Peterson JA, Brown P (1979). Characterization of cells cultured from early lactation milks. *In Vitro* **15**:356–362.

Chang SE, Keen J, Lane EB, Taylor-Papadimitriou J (1982). Establishment and characterisation of SV40-transformed human breast epithelial cell lines. *Cancer Res.* **42**:2040–2053.

Chen YC, Lee DC, Hsiao CY, Chung YF, Chen HC, Thomas JP (2009). The effect of ultra-nanocrystalline diamond films on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials* **30**:3428–3435.

Chopin D, Barei-Moniri R, Maille P, Le Frere-Belda MA, Muscatelli-Groux B, Merendino N, Lecerf L, Stoppacciaro A, Velotti F (2003). Human urinary bladder transitional cell carcinomas acquire the functional Fas ligand during tumor progression. *Am. J. Pathol.* **162**:1139–1149.

Chopra DP, Xue-Hu IC (1993). Secretion of alpha-amylase in human parotid gland epithelial cell culture. *J. Cell. Physiol.* **155**:223–233.

Chopra DP, Grignon DJ, Joiakim A, Mathieu PA, Mohamed A, Sakr WA, Powell IJ, Sarkar FH (1996). Differential growth factor responses of epithelial cell cultures derived from normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and primary prostate carcinoma. *J. Cell Physiol.* **169**:269–280.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**:347–349.

Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, Vlig M, van den Bogaerdt AJ, Breetveld M, Gibbs S, Middelkoop E, Ulrich MM (2007). Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant.* **16**:649–661.

Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanne R, Ikonomi P (2007). Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **43**:344351.

Corlu A, Ilyin G, Cariou S, Lamy I, Loyer P, Guguen-Guillouzo C (1997). The coculture: A system for studying the regulation of liver differentiation/proliferation activity and its control. *Cell Biol. Toxicol.* **13**:235–242.

Creasey AA, Smith HS, Hackett AI, Fukuyama K, Epstein WL, Madin SH (1979). Biological properties of human melanoma cells in culture. *In Vitro* **15**:342.

Cronauer MV, Eder IE, Hittmair A, Sierek G, Hobisch A, Culig Z, Thurnhur M, Bartsch G, Klocker H (1997). A reliable system for the culture of human prostatic cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:742–744.

Csoka K, Nygren P, Graf W, Påhlman L, Glimelius B, Larsson R (1995). Selective sensitivity of solid tumors to suramin in primary cultures of tumor cells from patients. *Int. J. Cancer* **63**:356–360.

Dairkee SH, Deng G, Stampfer MR, Waldman FM, Smith HS (1995). Selective cell culture of primary breast carcinoma. *Cancer Res.* **55**:2516–2519.

Dairkee SH, Paulo SC, Traquina P, Moore DH, Ljung BM, Smith HS (1997). Partial enzymatic degradation of stroma allows enrichment and expansion of primary breast tumor cells. *Cancer Res.* **57**:1590–1596.

Danielson KG, McEldrew D, Alston JT, Roling DB, Damjanov A, Damjanov I, Daska I, Spinner N (1992). Human colon carcinoma cell lines from the primary tumor and a lymph node metastasis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28A**:7–10.

Darcy KM, Shoemaker SF, Lee P-PH, Vaughan MM, Black JD, Ip MM (1995). Prolactin and epidermal growth factor regulation of the proliferation, morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells in three dimensional primary culture. *J. Cell. Physiol.* **163**:346–364.

Darling, J. L. (2004). In vitro culture of malignant brain tumors. In Pfragner, R., & Freshney, R.˙I. (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ, Wiley-Liss, pp. 349–372.

Dart J (2003). Corneal toxicity: The epithelium and stroma in iatrogenic and factitious disease. *Eye* **17**:886–892.

Davis, JB, Stroobant P (1990). Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell. Biol.* **110**:1353–1360.

Dawson-Baglien EM, Winkler PA, Bruewer AR, Petersen-Jones SM, Bartoe JT (2014). Isolation and cultivation of canine uveal melanocytes. *Vet. Ophthalmol.* 18:285–90. (PMID: 25176505).

De Vitry F, Camier M, Czernichow P, Benda P, Cohen P, Tixier-Vidal A (1974). Establishment of a clone of mouse hypothalamic neurosecretory cells synthesizing neurophysin and vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:3575–3579.

Deshpande AK, Baig MA, Carleton S, Wadgoankar R, Siddiqui MAQ (1993). Growth factors activate cardiogenic differentiation in avian mesodermal cells. *Mol. Cell Differ.* **1**:269–284.

Dimitroulakos J, Squire J, Pawlin G, Yeger H (1994). NUB-7: A stable-1-type human neuroblastoma cell line inducible along N- and S-type cell lineages. *Cell Growth Differ.* **5**:373–384.

Dorrell C, Abraham SL, Lanxon-Cookson KM, Canaday PS, Streeter PR, Grompe M (2008). Isolation of major pancreatic cell types and long-term culture-initiating cells using novel human surface markers. *Stem Cell Res.* **1**:183–194.

Doucette JR (1984). The glial cells in the nerve fibre layer of the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.* **210**:285–391.

Doucette JR (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* **3**:433–449.

Doyle A, Griffiths JB, Newall DG (eds.). (1990–1999). *Cell and tissue culture: Laboratory procedures.* Chichester, UK: Wiley.

Drexler HG (2004). Establishment and culture of human leukemia-lymphoma cell lines. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 319–348.

Drexler HG, Minowada J (2000). Human leukemia-lymphoma cell lines: Historical perspective, state of the art and future prospects. In Masters JRW, Palsson BO (eds.), *Human cell culture, Vol. III. Cancer cell lines, Part 3: Leukemia and lymphomas,* Dordrecht: Kluwer, pp. 1–88.

Du Y, Funderburgh JL (2007). Culture of human corneal stem cells. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells.* Hoboken, NJ: Wiley, pp. 251–280.

Duksin D, Maoz A, Fuchs S (1975). Differential cytotoxic activity of anticollagen serum on rat osteoblasts and fibroblasts in tissue culture. *Cell* **5**:83–86.

Dupin E, Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, le Douarin NM (2003). Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages, transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5229–5233.

Edington KG, Berry IJ, O'Prey M, Burns JE, Clark LJ, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, Coggins LW, Parkinson EK (2004). Multistage head and neck squamous cell carcinoma. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 261–288.

Edwards PAW, Easty DM, Foster CS (1980). Selective culture of epithelioid cells from a human squamous carcinoma using a monoclonal antibody to kill fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **4**:917–922.

Ernsberger U (2008). The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. *Cell Tissue Res.* **333**:353–371.

Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ, Frank TS, Weber BL (1993). Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res.* **53**:627–635.

Evans-Molina C, Vestermark GL, Mirmira RG (2009). Development of insulin-producing cells from primitive biologic precursors. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **14**:56–63.

Fael Al-Mayhani TM, Ball SL, Zhao JW, Fawcett J, Ichimura K, Collins PV, Watts C (2009). An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. *J. Neurosci. Methods* **176**:192–199.

Fantini J, Galons JP, Abadie B, Canioni P, Cozzone PJ, Marvali J, Tirard A (1987). Growth in serum-free medium of human colonic adenocarcinoma cell lines on microcarriers: A two-step method allowing optimal cell spreading and growth. *In Vitro* **23**:641–646.

Federoff S, Richardson A (2001). *Protocols for neural cell culture.* Clifton, NJ: Humana Press.

Fergusson RJ, Carmichael J, Smyth JF (1980). Human tumour xenografts growing in immunodeficient mice: A useful model for assessing chemotherapeutic agents in bronchial carcinoma. *Thorax* **41**:376–380.

Fitzsimmons SA, Ireland H, Barr NI, Cuthbert AP, Going JJ, Newbold RF, Parkinson EK (2003). Human squamous cell carcinomas lose a mortality gene from chromosome 6q14.3 to q15. *Oncogene* **22**:1737–1746.

Folkman J, Haudenschild C (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**:551–556.

Frame M, Freshney RI, Shaw R, Graham DI (1980). Markers of differentiation in glial cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **4**:732.

Franklin JM, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC (1996). Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory-nerve-ensheathing-cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia* **17**:217–224.

Franklin RJM, Barnett SC (1997). Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J. Neurosci. Res.* **50**:1–8.

Franssen EH, De Bree FM, Essing AH, Ramon-Cueto A, Verhaagen

J (2008). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing glia and Schwann cells indicates distinct tissue repair characteristics of olfactory ensheathing glia. *Glia* **56**:1285–1298.

Freedman VH, Shin S (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* **3**:355–359.

Freshney RI (1972). Tumour cells disaggregated in collagenase. *Lancet* **2**:488–489.

Freshney RI (1980). Culture of glioma of the brain. In Thomas DGT, GrahamDI (eds.), *Brain tumours: Scientific basic, clinical investigation and current therapy*. London: Butterworths, pp. 21–50.

Freshney RI, Freshney MG (eds.). (1996). *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss.

Freshney RI, Freshney MG (ed.). (2002). *Culture of epithelial cells*, 2nd ed., Hoboken, NJ: Wiley-Liss.

Freshney RI, Morgan D, Hassanzadah M, Shaw R, Frame M (1980a). Glucocorticoids, proliferation and the cell surface. In RichardsRJ, RajanKT (eds.), *Tissue culture in medical research. (II)*. Oxford, UK: Pergamon Press, pp. 125–132.

Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D (1980b). Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. *Br. J. Cancer* **41**:857–866.

Freshney RI, Hart E, Russell JM (1982). Isolation and purification of cell cultures induced leukemic cells in vitro; 2: Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**:378–382.

Freshney RI, Pragnell IB, Freshney MG (eds.). (1994). *Culture of Haemopoietic Cells*. New York: Wiley-Liss.

Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus- from human tumours. In ReidE, CookGMW, MooreDJ (eds.), *Cancer cell organelles; methodological surveys. (B): Vol. 2. Biochemistry*,. Chicester, UK: Horwood, pp. 97–110.

Fry J, Bridges JW (1979). The effect of phenobarbitone on adult rat liver cells and primary cell lines. *Toxicol. Lett.* **4**:295–301.

Fu VX, Schwarze SR, Reznikoff CA, Jarrard DF (2004). The establishment and characterization of bladder cancer cultures in vitro. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 97–123.

Fusenig NE (1994a). Epithelial–mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. In LeighIM, LaneEB, WattFM (eds.), *Keratinocyte handbook*, Vol. I. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, pp. 71–94.

Fusenig NE (1994b). Cell culture models: Reliable tools in pharmacotoxicology? In FusenigNE, GrafH (eds.), *Cell culture in pharmaceutical research*. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1–7.

Fusenig NE, Boukamp P (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinogen.* **23**:144–158.

Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T (2003). Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* **52**:2007–2015.

Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* **50**:5488–5496.

Gilbert SF, Migeon BR (1975). d-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* **5**:11–17.

Gilbert SF, Migeon BR (1977). Renal enzymes in kidney cells selected by d-valine medium. *J. Cell. Physiol.* **92**:161–168.

Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C.(2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J. Biol. Chem.* **277**:49220–49229.

Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJ (1974). Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" mice; II: Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**:921.

Glaise D, Ilyin GP, Loyer P, Cariou S, Bilodeau M, Lucas J, Puisieux A, Ozturk M, Guguen-Guillouzo C (1998). Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth Differ.* **9**:165–176.

Goldberg B (1977). Collagen synthesis as a marker for cell type in mouse 3T3 lines. *Cell* **11**:169–172.

Goldman BI, Wurzel J (1992). Effects of subcultivation and culture medium on differentiation of human fetal cardiac myocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28A**:109–119.

Goldstein S, Murano S, Benes H, Moerman EJ, Jones RA, Thweatt R (1989). Studies on the molecular genetic basis of replicative senescence in Werner syndrome and normal fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **24**(5–6):461–468.

Gomm JJ, Coope RC, Browne PJ, Coombes RC (1997). Separated human breast epithelial and myoepithelial cells have different growth factor requirements in vitro but can reconstitute normal breast lobuloalveolar structure. *J. Cell. Physiol.* **171**:11–19.

Gordon KE, Ireland H, Roberts M, Steeghs K, McCaul JA, MacDonald DG, Parkinson EK (2003). High levels of telomere dysfunction bestow a selective disadvantage during the progression of human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**:458–467.

Gower WR, Risch RM, Godellas CV, Fabri PJ (1994). HPAC, a new human glucocorticoid sensitive pancreatic ductal adenocarcinoma cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30A**:151–161.

Grafström RC (2002). Transcript profiling of enzymes involved in detoxification of xenobiotics and reactive oxygen in human normal and Simian virus 40 T antigen-immortalized oral keratinocytes. *Int. J. Cancer* **99**:776–782.

Graziadei PPC, Monti Graziadei GA (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals; I: Morphological aspects of differentiation and structural organisation of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytol.* **8**:1–18.

Graziadei PPC, Monti Graziadei GA (1980). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals; III: Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the *fila olfactoria* in rat. *J. Neurocytol.* **9**:145–162.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(24):15655–15660.

Guiraud JM, Beuron F, Sion B, Brassier G, Faivre J, Thieulant ML, Duval J (1991). Human prolactin producing pituitary adenomas in three dimensional culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27a**:188–190.

Guner M, Freshney RI, Morgan D, Freshney MG, Thomas DGT, Graham DI (1977). Effects of dexamethasone and betamethasone on in vitro cultures from human astrocytoma. *Br. J. Cancer* **35**:439–447.

Halaban R (2004). Culture of melanocytes from normal, benign, and malignant lesions. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 289–318.

Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**:461–463.

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line. (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* **43**:5379–5389.

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR (1984). Serum free growth of human mammary epithelial cells: Rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5435–5439.

Hartley RS, Yablonka-Reuveni Z (1990). Long-term maintenance of primary myogenic cultures on a reconstituted basement membrane. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26**:955–961.

Haudenschild CC, Zahniser D, Folkman J, Klagsbrun M (1976). Human vascular endothelial cells in culture. *Exp. Cell Res.* **98**:175–183.

Hayashi I, Sato GH (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* **259**:132–134.

Haynes LW (1999). *The neuron in tissue culture*. Chichester, UK: Wiley.

Heinzman JM, Brower SL, Bush JE (2008). Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions. *Cancer Cell Int.* **10**:11.

Hofmann S, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Meinel L (2006). *Tisue engineering of bone*. In Vunjak-Novokovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 325–373.

Holt SE, Shay JW, Wright WE (1996). Refining the telomere–telomerase hypothesis of ageing and cancer. *Nat. Biotechnol.* **14**:836–839.

Horibata K, Harris AW (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.* **60**:61–77.

Hu DN. Savage HE, Roberts JE (2002). Uveal melanocytes, ocular pigment epithelium, and Müller cells in culture: In vitro toxicology. *Int. J. Toxicol.* **21**(6):465–472.

Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J.* **32**(20):2708–2721.

Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E (2007). In vitro culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth Factors* **25**:236–252.

Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* **68**:918–926.

Iguchi H, Mizumoto K, Shono M, Kono A, Takiguchi S (2004). Pancreatic cancer-derived cultured cells: Genetic alterations and application to an experimental model of pancreatic cancer metastasis. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 81–96.

Ilsie AW, Puck TT (1971). Morphological transformation of Chinese hamster cells by dibutyryl adenosine cycline 3′:5′-monophosphate and testosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2**:358–361.

Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD (1998). Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* **18**:6176–6185.

Iscove N, Melchers F (1978). Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **147**:923–933.

Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5096–5100.

Jinard F, Sergent-Engelen T, Trouet A, Remacle C, Schneider Y-J (1997). Compartment coculture of porcine arterial endothelial and smooth muscle cells on a microporous membrane. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**:92–103.

Jones RJ, Matsui WH, Smith BD (2004). Cancer stem cells: Are we missing the target? *J. Natl. Cancer Inst.* **96**:583–585.

Jozan S, Roche H, Cheutin F, Carton M, Salles B (1992). New human ovarian cell line OVCCR1/sf in serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28A**:687–689.

Kanczkowski W, Zacharowski K, Wirth MP, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR (2009). Differential expression and action of toll-like receptors in human adrenocortical cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **300**:57–65.

Kao FT, Puck TT (1968). Genetics of somatic mammalian cells; VII: Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**:1275–1281.

Kao W-Y, Prockop DI (1977). Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations. *Nature* **266**:63–64.

Kato R, Maeda T, Akaike T, Tamai I (2009). Characterization of nucleobase transport by mouse Sertoli cell line TM4. *Biol. Pharm. Bull.* **32**:450–455.

Keith WN (2003). In situ analysis of telomerase RNA gene expression as a marker for tumor progression. *Methods Mol. Med.* **75**:163–176.

Kelly JH, Sussman NL (2000). A fluorescent cell-based assay for cytochrome P-450 isozyme 1A2 induction and inhibition. *J. Biomol. Screen.* **5**:249–254.

Klar AS, Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Michalak K, Kisiel M, Reichmann E, Meuli M (2014). Differential expression of granulocyte, macrophage, and hypoxia markers during early and late wound healing stages following transplantation of tissue-engineered skin substitutes of human origin. *Pediatr. Surg. Int.* **30**:1257–1264.

Klein B, Pastink A, Odijk H, Westerveld A, van der Eb AJ (1990). Transformation and immortalization of diploid xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **191**:256–262.

Klevjer-Anderson P, Buehring GC (1980). Effect of hormones on growth rates of malignant and nonmalignant human mammary epithelia in cell culture. *In Vitro* **16**:491–501.

Klinger RY, Niklason LE (2006). Tissue-engineered blood vessels. In Vunjak-NovakovicG, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 294–322.

Klug CA, Jordan CT (2002). *Hematopoietic stem cell protocols*. Clifton, NJ: Humana Press.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**:497–499.

Koopman LA, Szuhai K, van Eendenburg JD, Bezrookove V, Kenter GG, Schuuring E, Tanke H, Fleuren GJ (1999). Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* **59**:5615–5624.

Kuriharcuch W, Green H (1978). Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:6107–6110.

Labarge MA, Petersen OW, Bissell MJ (2007). Culturing mammary stem cells. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 282–302.

Lan S, Smith HS, Stampfer MR (1981). Clonal growth of normal and malignant human breast epithelia. *J. Surg. Oncol.* **18**:317–322.

Lasfargues EY (1973) Human mammary tumors. In Kruse P, Patterson MK (eds.), *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press, pp. 45-50.

Leake RE, Freshney RI, Munir I (1987). Steroid responses in vivo and in vitro. In GreenB, LeakeRE (eds.), *Steroid hormones, a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 205–218.

Leder A, Leder P (1975). Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell* **5**:319–322.

Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR (2008). Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin. Cancer Res.* **14**:4743–4750.

Lee LEJ, Dayeh VR, Schirmer K, Bols NC (2009). Applications and potential uses of fish gill cell lines: Examples with RTgill-W1. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **45**:127–134.

Leigh IM, Watt FM (1994). *Keratinocyte methods*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.

Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998). Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Res-

toration of the differentiated phenotype and of the metabolic response to interleukin-1β. *J. Cell. Physiol.* **176**:303–313.

Lennon D, Caplan A (2006). Mesenchymal stem cells. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 23–60.

Léobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:7808–7811.

LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF (2005). On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit. Rev. Neurobiol.* **17**:27–50.

Levi-Montalcini RC (1979). The nerve-growth factor. *Sci. Am.* **240**:68.

Levin DB, Wilson K, Valadares de Amorim G, Webber J, Kenny P, Kusser W (1995). Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi. *Cancer Res.* **55**:4278–4282.

Li NF, Broad S, Lu YJ, Yang JS, Watson R, Hagemann T, Wilbanks G, Jacobs I, Balkwill F, Dafou D, Gayther SA (2007). Human ovarian surface epithelial cells immortalized with hTERT maintain functional pRb and p53 expression. *Cell Prolif.* **40**:780–794.

Li YM, Schacher DH, Liu Q, Arkins S, Rebeiz N, McCusker RH Jr, Dantzer R, Kelley KW (1997). Regulation of myeloid growth and differentiation by the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology*. **138**:362–368.

Li Y, Decherchi P, Raisman G (2003a) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J. Neurosci.* **23**:727–731.

Li Y, Sauvé Y, Li D, Lund RD, Raisman G (2003b) Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons. *J. Neurosci.* **23**:7783–7788.

Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004). Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* **164**:1007–1019.

Limat A, Breitkreutz D, Thiekötter G, Klein EC, Braathen LR, Hunziker T, Fusenig NE (1995). Formation of a regular neo-epidermis by cultured human outer root sheath cells grafted on nude mice. *Transplantation* **59**:1032–1038.

Liu JY, Hafner J, Dragieva G, Burg G (2004). Bioreactor microcarrier cell culture system. (Bio-MCCS) for large-scale production of autologous melanocytes. *Cell Transplant.* **13**:809–816.

Liu TF, Cohen KA, Willingham MC, Tatter SB, Puri RK, Frankel AE (2003). Combination fusion protein therapy of refractory brain tumors: Demonstration of efficacy in cell culture. *J. Neurooncol.* **65**:77–85.

Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**:110–113.

Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot M-J, Mes-Masson A-M (1994). Primary cultures of normal and tumoral ovarian epithelium: A powerful tool for basic molecular studies. *Exp. Cell Res.* **215**:303–309.

Lundqvist M, Mark J, Funa K, Heldin NE, Morstyn G, Weddell B, Layton J, Oberg K (1991). Characterisation of a cell line. (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. *Eur. J. Cancer* **12**:1662–1668.

Maas-Szabowski N, Fusenig NE, Shimotoyodome A (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast co-cultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell Sci.* **112**:1843–1853.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2000). Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced KGF expression in resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **114**:1075–1084.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE (2002). Cell interaction and epithelial differentiation. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 31–63.

MacDonald C (1994). Immortalization of hematopoietic cells. In Freshney RI, Pragnell IB, Freshney MG (eds.), *Culture of hematopoietic cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 181–203.

MacDonald CM, Freshney RI, Hart E, Graham DI (1985). Selective control of human glioma cell proliferation by specific cell interaction. *Exp. Cell Biol.* **53**:130–137.

Mal A, Harter ML (2003). MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:1735–1739.

Malvestiti F, Colombo D, Perego D, Rodeschini O, Finelli P, Larizza L, Giardino D (2009). Fluorescence in situ hybridization dissection of a chronic myeloid leukemia case bearing the apparently balanced translocations. (9;22)(q34;q11.2) and. (11;11)(p15;q13). *Cancer Genet. Cytogenet.* **188**:42–47.

Maramorosch K (1976). *Invertebrate tissue culture*. New York: Academic Press.

Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Kirk C, Hendricks M, Danehy F, Misumi D, Sudhalter J, Kobayashi K, Wroblewski D, Lynch C, Baldassare M, Hiles I, Davis JB, Hsuan JJ, Totty NF, Otsu M, McBurney RN, Waterfield MD, Stroobant P, Gwynne D (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**:312–318.

Marques da Silva C, Miranda Rodrigues L, Passos da Silva Gomes A, Mantuano Barradas M, Sarmento Vieira F, Persechini PM, Coutinho-Silva R (2008). Modulation of P2X7 receptor expression in macrophages from mineral oil-injected mice. *Immunobiology* **213**:481–492.

Marsh JW, Donovan M, Burholt DR, George LD, Kornblith PL (2004). Metastatic lung disease to the central nervous system: in vitro response to chemotherapeutic agents. *J. Neurooncol.* **66**:81–90.

Masters JRW, Palsson B (eds.). (1999–2000). *Human cell culture*, Vols. I, II. Dordrecht: Kluwer.

Mather J (1979). Testicular cells in defined medium. In Jakoby WB, Pastan IH (eds.), *Methods in enzymology; Vol. 57: Cell culture*. New York: Academic Press, p. 103.

Mather, J. P., & Sato, G. H. (1979a). The growth of mouse melanoma cells in hormone supplemented, serum-free medium. *Exp. Cell Res.* **120**:191.

Mather, J. P., & Sato, G. H. (1979b). The use of hormone supplemented serum-free media in primary cultures. *Exp. Cell Res.* **124**:215.

Matsumoto S, Arakawa Y, Ohishi M, Yanaihara H, Iwanaga T, Kurokawa N (2008). Suppressive action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. (PACAP) on proliferation of immature mouse Leydig cell line TM3 cells. *Biomed. Res.* **29**:321–330.

Menasche P (2004). Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2**:21–28.

Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* **357**:279–280.

Messing EM, Fahey JL, deKernion JB, Bhuta SM, Bubbers JE (1982). Serum-free medium for the in vitro growth of normal and malignant urinary bladder epithelial cells. *Cancer Res.* **42**:2392–2397.

Midgley CA, Craig AL, Hite JP, Hupp TR (1998). Baculovirus expression and the study of the regulation of the tumor suppressor protein p53. In Ravid K, Freshney RI (eds.), *DNA transfer to cultured cells*. New York: Wiley-Liss, pp. 27–54.

Miklic S, Juric DM, Caman-Krzan M (2004). Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22**:119–130.

Mills JB, Rose KA, Sadagopan N, Sahi J, de Morais SM (2004). Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**:303–309.

Milo GE, Ackerman GA, Noyes I (1980). Growth and ultrastructural

characterization of proliferating human keratinocytes in vitro without added extrinsic factors. *In Vitro* **16**:20–30.

Mohammad RM, Li Y, Mohamed AN, Pettit GR, Adsay V, Vaitkevicius VK, Al-Katib AM, Sarkar FH (1999). Clonal preservation of human pancreatic cell line derived from primary pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **19**:353–361.

Monaghan SR, Kent ML, Watral VG, Kaufman RJ, Lee LE, Bols NC (2009). Animal cell cultures in microsporidial research: Their general roles and their specific use for fish microsporidia. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **45**:135–147.

Monstein HJ, Ohlsson B, Axelson J (2001). Differential expression of gastrin, cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptor mRNA in human pancreatic cancer cell lines. *Scand. J. Gastroenterol.* **36**:738–743.

Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967). Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**:519–524.

Morgan JE, Beauchamp JR, Pagel CN, Peckham M, Ataliotis P, Jat PS, Noble MD, Farmer K, Partridge TA (1994). Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: A model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev. Biol.* **162**: 486–498.

Mothersill C, Austin B (2000). *Aquatic invertebrate cell culture.* Chichester, UK: Springer/Praxis.

Moulton DG (1974). Dynamics of cell populations in the olfactory epithelium. *Ann. NY Acad. Sci.* **237**:52–61.

Murakami H, Masui H (1980). Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:3464–3468.

Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park H-Y, Gilchrest BA (1991). Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol.* **125**:297–303.

Neumann T, Hauschka SD, Sanders JE (2003). Tissue engineering of skeletal muscle using polymer fiber arrays. *Tissue Eng.* **9**:995–1003.

O'Hare MJ, Ellison ML, Neville AM (1978). Tissue culture in endocrine research: Perspectives, pitfalls, and potentials. *Curr. Top. Exp. Endocrinol.* **3**:1–56.

Oh CK, Kwon YW, Kim YS, Jang HS, Kwon KS (2003). Expression of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1 related to microvessel density in nonaggressive and aggressive basal cell carcinomas. *J. Dermatol.* **30**:306–313.

Oie HK, Russell EK, Carney DN, Gazdar AF (1996). Cell culture methods for the establishment of the NCI series of lung cancer cell lines. *J. Cell Biochem. Suppl.* **24**:24–31.

Olie RA, Looijenga LHJ, Dekker MC, de Jong FH, van Dissel-Emiliani FMF, de Rooij DG, van der Holt B, Oosterhuis JW (1995). Heterogeneity in the in vitro survival and proliferation of human seminoma cells. *Br. J. Cancer* **71**:13–17.

Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med.* **15**:701–706.

Orly J, Sato G, Erickson GF (1980). Serum suppresses the expression of hormonally induced function in cultured granulosa cells. *Cell* **20**:817–827.

Osborne CK, Hamilton B, Tisus G, Livingston RB (1980). Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* **40**:2361–2366.

Ostertag W, Pragnell IB (1978). Changes in genome composition of the Friend virus complex in erythroleukaemia cells during the course of differentiation induced by DMSO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3278–3282.

Ostertag W, Pragnell IB (1981). Differentiation and viral involvement in differentiation of transformed mouse and rat erythroid cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **94/95**:143–208.

Owens RB, Smith HS, Hackett AJ (1974). Epithelial cell culture from normal glandular tissue of mice. Mouse epithelial cultures enriched by selective trypsinisation. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**:261–269.

Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmar W, Schlimok G, Weckermann D, Oberneder R, Fanning E, Rietmüller G (1995). Establishment of micrometastatic cell lines: A novel source of tumor cell vaccines. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**:1162–1168.

Paraskeva C, Williams AC (1992). The colon. In Freshney RI (ed.), *Culture of epithelial cells.* New York: Wiley-Liss, pp. 82–105.

Paraskeva C, Buckle BG, Thorpe PE (1985). Selective killing of contaminating human fibroblasts in epithelial cultures derived from colorectal tumors using an anti-Thy-1 antibody-ricin conjugate. *Br. J. Cancer* **51**:131–134.

Park JG, Gazdar AF (1996). Biology of colorectal and gastric cancer cell lines. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **24**:131–141.

Park J-G, Ku J-L, Kim H-S, Park S-Y, Rutten MJ (2004). Culture of normal and malignant gastric epithelium. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 23–66.

Pavelic K, Antonic M, Pavelic L, Pavelic J, Pavelic Z, Spaventi S (1992). Human lung cancers growing on extracellular matrix: Expression of oncogenes and growth factors. *Anticancer Res.* **12**:2191–2196.

Pedersen N, Mortensen S, Sorensen SB, Pedersen MW, Rieneck K, Bovin LF, Poulsen HS (2003). Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **63**(8):1943–1953.

Peehl DM (2002). Human prostatic epithelial cells. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of Epithelial Cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 171–194.

Pereira-Smith O, Smith J (1988). Genetic analysis of indefinite division in human cells: Identification of four complementation groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6042–6046.

Perl A-K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**:190–193.

Petersen OW, Gudjonsson T, Villadsen R, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L (2003). Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif.* **36**. (Suppl. 1):33–44.

Pinnel SR, Murad S, Darr D (1987). Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch. Dermatol.* **123**:1684–1686.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Weiss H, Bell WC, Heimburger DC, Grizzle WE (2002). Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin. Cancer Res.* **8**:734–744.

Pollard JW, Walker JM (eds.). (1990). *Animal cell culture. Vol. 5. Methods in molecular biology.* Clifton, NJ, Humana Press, pp. 83–97.

Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Wang J, Ittmann M (2004). FGF17 is an autocrine prostatic epithelial growth factor and is upregulated in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **60**:18–24.

Pontén J, Macintyre EH (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**(4):465–486.

Prince GA, Jenson AB, Billups LC, Notkins AL (1978). Infection of human pancreatic beta cell cultures with mumps virus. *Nature* **271**:158–161.

Raff MC, Abney E, Brockes JP, Hornby-Smith A (1978). Schwann cell growth factors. *Cell* **15**:813–822.

Raff MC, Fields KL, Hakomori SL, Minsky R, Pruss RM, Winter J (1979). Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* **174**:283–309.

Rainey WE, Saner K, Schimmer BP (2004). Adrenocortical cell lines. *Mol. Cell Endocrinol.* **228**:23–38.

Rainov NG, Ren H (2003). Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy—what have we learned? *J. Neurooncol.* **65**:227–236.

Raisman G (2001). Olfactory ensheathing cells—another miracle cure for spinal cord injury? *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:369–75.

Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang S-N, Filmus J, Kerbel RS (1995). Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: Suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *J. Cell Biol.* **131**:1587–1598.

Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.* **18**:3803–3815.

Ravid K, Freshney RI (eds.). (1998). *DNA transfer to cultured cells.* New York: Wiley-Liss.

Ray ME, Yang ZQ, Albertson D, Kleer CG, Washburn JG, Macoska JA, Ethier SP (2004). Genomic and expression analysis of the 8p11–12 amplicon in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **64**:40–47.

Rheinwald JG, Beckett MA (1981). Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **41**:1657–1663.

Rheinwald JG, Green H (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**:331–344.

Richler C, Yaffe D (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* **23**:1–22.

Roet KC, Verhaagen J (2014). *Exp. Neurol.* **261C**:594−609

Rofstad EK (1994). Orthotopic human melanoma xenograft model systems for studies of tumor angiogenesis, pathophysiology, treatment sensitivity and metastatic pattern. *Br. J. Cancer* **70**:804–812.

Rosenblatt JD, Parry DJ, Partridge TA (1996). Phenotype of adult mouse muscle myoblasts reflects their fiber type of origin. *Differentiation* **60**: 39–45.

Rossi GB, Friend C (1967). Erythrocytic maturation of. (Friend) virus-induced leukemic cells in spleen clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**:1373–1380.

Ruff MR, Pert CB (1984). Small cell carcinoma of the lung: Macrophage-specific antigens suggest hematopoietic stem cell origin. *Science* **225**:1034–1036.

Sá R, Neves R, Fernandes S, Alves C, Carvalho F, Silva J, Cremades N, Malheiro I, Barros A, Sousa M (2008). Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **79**:962−975.

Saalbach A, Aust G, Haustein UF, Herrmann K, Anderegg U (1997). The fibroblast-specific MAb AS02: A novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res.* **290**:593–599.

Santiago-Walker A, Li L, Haass NK, Herlyn M (2009). Melanocytes: from morphology to application. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**:114−121.

Sasaki M, Honda T, Yamada H, Wake N, Barrett JC (1996). Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res.* **54**:6090–6093.

Sato GH, Yasumura Y (1966). Retention of differentiated function in dispersed cell culture. *Trans. NY Acad. Sci.* **28**:1063–1079.

Schwob J (2002) Neuronal regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* **269**:33–49.

Seifert HH, Meyer A, Cronauer MV, Hatina J, Müller M, Rieder H, Hoffmann MJ, Ackermann R, Schulz WA (2007). A new and reliable culture system for superficial low-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World J. Urol.* **25**:297−302.

Selby PJ, Thomas MJ, Monaghan P, Sloane J, Peckham MJ (1980). Human tumour xenografts established and serially transplanted in mice immunologically deprived by thymectomy, cytosine arabinoside and whole-body irradiation. *Br. J. Cancer* **41**:52.

Seruya M, Shah A, Pedrotty D, du Laney T, Melgiri R, McKee JA, Young HE, Niklason LE (2004). Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* **13**:93–101.

Shea CM, Edgar CM, Teinhorn TA, Louis C, Gerstenfeld LC (2003). BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Cell. Biochem.* **90**:1112–1127.

Shih SJ, Dall'Era MA, Westphal JR, Yang J, Sweep CG, Gandour-Edwards R, Evans CP (2003). Elements regulating angiogenesis and correlative microvessel density in benign hyperplastic and malignant prostate tissue. *Prostate Cancer Prostat. Disord.* **6**:131–137.

Smagghe G, Goodman CL (2009). Applications and future directions in Invertebrate and fish cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **45**:91−92.

Smagghe G, Goodman CL, Stanley D (2009). Insect cell culture and applications to research and pest management. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **45**:93−105.

Smith HS, Lan S, Ceriani R, Hackett AJ, Stampfer MR (1981). Clonal proliferation of cultured non-malignant and malignant human breast epithelia. *Cancer Res.* **41**:4637–4643.

Smith HS, Owens RB, Hiller AJ, Nelson-Rees WA, Johnston JO (1976). The biology of human cells in tissue culture; I: Characterization of cells derived from osteogenic sarcomas. *Int. J. Cancer* **17**:219–234.

Smyth MJ, Rodney L, Sparks RL, Wharton W (1993). Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* **106**:1–9.

Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold Aldea S, Hartwieg EA, Cepko CL (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in developmnt of mouse cerebellum. *Cell* **68**:33−51.

Solassol J, Crozet C, Lehmann S (2003). Prion propagation in cultured cells. *Br. Med. Bull.* **66**:87–97.

Speirs V (2004). Primary culture of human mammary tumor cells. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 205–219.

Speirs V, Green AR, White MC (1996). Collagenase III: A superior enzyme for complete disaggregation and improved viability of normal and malignant human breast tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **32**:72–74.

Stampfer M, Halcones RG, Hackett AJ (1980). Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* **16**:415–425.

Stampfer MR, Yaswen P, Taylor-Papadimitriou J (2002). Culture of human mammary epithelial cells. In Freshney RI, Freshney MG (eds.), *Culture of epithelial cells*, 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 95–135.

Stanley MA, Parkinson E (1979). Growth requirements of human cervical epithelial cells in culture. *Int. J. Cancer* **24**:407–414.

Steele MP, Levine RA, Joyce-Brady M, Brody JS (1992). A rat alveolar type II cell line developed by adenovirus 12SE1A gene transfer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**:50–56.

Stern P, West C, Burt D (2004). Culture of cervical carcinoma cell lines. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 179–204.

Subramanian M, Madden JA, Harder DR (1991). A method for the isolation of cells from arteries of various sizes. *J. Tissue Cult. Methods* **13**:13–20.

Takahashi H, Yanagi Y, Tamaki Y, Muranaka K, Usui T, Sata M (2004). Contribution of bone-marrow-derived cells to choroidal neovascularization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**:372–375.

Takahashi M, Galligan C, Tessarollo L, Yoshimura T (2009). Monocyte chemoattractant protein-1. (MCP-1), not MCP-3, is the primary chemokine required for monocyte recruitment in mouse peritonitis induced with thioglycollate or zymosan A. *J. Immunol.* **183**:3463−3471.

Tashjian AH Jr (1979). Clonal strains of hormone-producing pitu-

itary cells. In JakobyWB, PastanIH (eds.), *Methods in enzymology; Vol. 57: Cell culture*. New York: Academic Press, pp. 527–535.

Tashjian AH, Yasamura Y, Levine L, Sato GH, Parker M (1968). Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* **82**:342–352.

Taylor DA (2001). Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* **2**:208–210.

Taylor SE, Shah M, Orriss IR (2014). Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey Rep.* **3**:585.

Taylor-Papadimitriou J, Purkiss P, Fentiman IS (1980). Choleratoxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **102**:317–322.

Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, Lewis A, Boshell M, Lane EB, Leigh IM (1989) Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: Relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J. Cell Sci.* **94**:403–413.

Thomas DGT, Darling JL, Paul EA, Mott TC, Godlee JN, Tobias JS, Capra LG, Collins CD, Mooney C, Bozek T, Finn GP, Arigbabu SO, Bullard DE, Shannon N, Freshney RI (1985). Assay of anti-cancer drugs in tissue culture: Relationship of relapse free interval. (FRI) and in vitro chemosensitivity in patients with malignant cerebral glioma. *Br. J. Cancer* **51**:525–532.

Thomson AA, Foster BA, Cunha GR (1997). Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* **124**:2431–2439.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145–1147.

Toft A, Scott D, Barnett SC, Riddell JS (2007). Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain* **130**:970–984.

Tomakidi P, Fusenig NE, Kohl A, Komposch G (1997). Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. *J. Periodont. Res.* **32**:388–400.

Topley P, Jenkins DC, Jessup EA, Stables JN (1993). Effect of reconstituted basement membrane components on the growth of a panel of human tumour cell lines in nude mice. *Br. J. Cancer* **67**:953–958.

Tsuruo T, Hamilton TC, Louis KG, Behrens BC, Young RC, Ozols RF (1986). Collateral susceptibility of adriamycin-, melphalan-, and cisplatin-resistant human ovarian tumor cells to bleomycin. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**:941–945.

Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* **30**:2110–2118.

Tveit KM, Pihl A (1981). Do cells lines in vitro reflect the properties of the tumours of origin? A study of lines derived from human melanoma xenografts. *Br. J. Cancer* **44**:775–786.

Uzgare AR, Xu Y, Isaacs JT (2004). In vitro culturing and characteristics of transit amplifying epithelial cells from human prostate tissue. *J. Cell. Biochem.* **91**:196–205.

Vago C (ed.). (1971). *Invertebrate tissue culture*, Vol. 1. New York: Academic Press.

Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**:205–2025.

Verschraegen CF, Hu W, Du Y, Mendoza J, Early J, Deavers M, Freedman RS, Bast RC Jr, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Giovanella BC (2003). Establishment and characterization of cancer cell cultures and xenografts derived from primary or metastatic Mullerian cancers. *Clin. Cancer Res.* **9**:845–852.

Vierick JL, McNamara P, Dodson MV (1996). Proliferation and differentiation of progeny of ovine unilocular fat cells. (adipofibroblasts). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**:564–572.

Vincan E, Whitehead RH, Faux MC (2008). Analysis of Wnt/FZD-mediated signalling in a cell line model of colorectal cancer morphogenesis. *Methods Mol Biol.* **468**:263–273.

Virant-Klun I, Zech N, Rožman P, Vogler A, Cvjetičanin B, Klemenc P, Maličev E, Meden-Vrtovec H (2008). Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation* **76**:843–856.

Visco V, Bava FA, d'Alessandro F, Cavallini M, Ziparo V, Torrisi MR (2009). Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J. Cell. Physiol.* **220**:204–213.

Von der Mark K (1986). Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology* **10**:272–315.

Vonen B, Bertheussen K, Giaever AK, Florholmen J, Burhol PG (1992). Effect of a new synthetic serum replacement on insulin and somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets in long term culture. *J. Tissue Cult. Methods* **14**:45–50.

Vunjak-Novakovic G (2006). Tissue engineering: Basic considerations. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 132–155.

Wang J, Torbenson M, Wang Q, Ro JY, Becich M (2003). Expression of inducible nitric oxide synthase in paired neoplastic and non-neoplastic primary prostate cell cultures and prostatectomy specimen. *Urol. Oncol.* **21**:117–122.

Watt FM (2001). Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:410–417.

Watt FM (2002). The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J. Dermatol. Sci.* **28**:173–180.

Wehder L, Arndt S, Murzik U, Bosserhoff AK, Kob R, von Eggeling F, Melle C (2009). Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. *Cell Cycle* **8**:1552–1558.

Weichselbaum R, Epstein I, Little JB (1976). A technique for developing established cell lines from human osteosarcomas. *In Vitro* **12**:833–836.

Westermark B, Pontén J, Hugosson R (1973). Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A* **81**:791–805.

Whitehead RH (2004). Establishment of cell lines from colon carcinoma. In Pfragner R, Freshney RI (eds.), *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 67–80.

Whitehead RH, Robinson PS (2009). Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from the intestinal tissue of adult normal and transgenic mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**:G455–G460.

Willmarth NE, Albertson DG, Ethier SP (2004). Chromosomal instability and lack of cyclin E regulation in hCdc4 mutant human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **6**:R531–R539.

Wilson, A. P. (2004). The development of human ovarian epithelial tumor cell lines from solid tumors and ascites. In *Culture of human tumor cells*, Ed. Pfragner, R., Freshney. R. I. , Hoboken, NJ, Wiley-Liss, pp. 145–178.

Wilson AP, Dent M, Pejovic T, Hubbold L, Radford H (1996). Characterisation of seven human ovarian tumour cell lines. *Br. J. Cancer* **74**:722–727.

Wilson C, Scullin P, Worthington J, Seaton A, Maxwell P, O'Rourke D, Johnston PG, McKeown SR, Wilson RH, O'Sullivan JM, Waugh DJJ (2008). Dexamethasone potentiates the antiangiogenic activity of docetaxel in castration-resistant prostate cancer. *Br. J. Cancer* **99**:2054–2064.

Wise C (2002). *Epithelial cell culture protocols*. Clifton, NJ: Humana Press.

Wistuba II, Bryant D, Behrens C, Milchgrub S, Virmani AK, Ashfaq R, Minna JD, Gazdar AF (1999). Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin.*

Cancer Res. **5**:991–1000.

Wu H, Friedman WJ, Dreyfus CF (2004). Differential regulation of neurotrophin expression in basal forebrain astrocytes by neuronal signals. *J. Neurosci. Res.* **76**:76–85.

Wu J, Rnjak-Kovacina J, Du Y, Funderburgh ML, Kaplan DL, Funderburgh JL (2014). Corneal stromal bioequivalents secreted on patterned silk substrates. *Biomaterials* **35**:3744–3755.

Wyllie FS, Bond JA, Dawson T, White D, Davies R, Wynford-Thomas D (1992). A phenotypically and karyotypically stable human thyroid epithelial line conditionally immortalized by SV40 large T antigen. *Cancer Res.* **52**:2938–2945.

Xing JG, El-Sweisi W, Lee LEJ, Cullodi P, Seymour C, Mothersill C, Bols NC (2009). Development of a zebrafsih spleen cell line, ZSSJ, and its growth arrest by gamma radiation and capacity to act as feeder cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **45**:163–174.

Yamaguchi N, Yamamura Y, Koyama K, Ohtsuji E, Imanishi J, Ashihara T (1990). Characterization of new pancreatic cancer cell lines which propagate in a protein-free chemically defined medium. *Cancer Res.* **50**:7008–7014.

Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulost S, Wang F, McKeehan WL (1992). Heparin binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal to epithelial cell andromedin. *Mol. Endocrinol.* **6**:2123–2128.

Yanai N, Suzuki M, Obinata M (1991). Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp. Cell Res.* **197**:50–56.

Yeager TR, DeVries S, Farrard DF, Kao C, Nakada SY, Monn TD, Bruskewitz R, Stadler WM, Meisner LF, Gilchrest KW, Newyton MA, Waldman FM, Reznikoff CA (1998). Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis. *Genes Dev.* **12**:163–174.

Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, Wittner BS, Stojanov P, Brachtel E, Sgroi D, Kapur R, Shioda T, Ting DT, Ramaswamy S, Getz G, Iafrate AJ, Benes C, Toner M, Maheswaran S, Haber DA (2014). Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* **345**:216–220.

Zaroff L, Sato GH, Mills SE (1961). Single-cell platings from freshly isolated mammalian tissue. *Exp. Cell Res.* **23**:565–575.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro A-M, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7**:1028–1034.

（王海杰　译）

第26章

干　细　胞

最近几年出现的最有可能得到培养的特化细胞的途径是从干细胞获得。干细胞的种类包括胚胎干细胞、骨髓和其他来源的间充质干细胞，或者是通过正常成体细胞改变特异性基因表达而诱导得到的多能干细胞（iPS 细胞）（参见短篇综述 26.2）。干细胞培养最初是从小鼠胚胎开始的，但从小鼠造血细胞培养得到了很大的提升，造血细胞谱系特异性标记分子的鉴定及造血组织相对容易获得，如骨髓，使其易分离和纯化（Yeung et al.，2009）（参见方案 26.10-Su）。从实体组织分离和培养干细胞还有很多悬而未决的问题，但随着技术的发展，已经从一些组织中鉴定和培养出干细胞，如乳腺（Welm et al.，2003；LaBarge et al.，2007）、肺（Tesei et al.，2009）、肠道（Booth et al.，1999）、肝（Alison et al.，2004）和皮肤（Nowak et al.，2009）。其中一个问题就是实体组织中的干细胞缺乏标记分子，但这方面也有了一些进展，这为细胞分选提供了可能。

26.1　胚胎干细胞

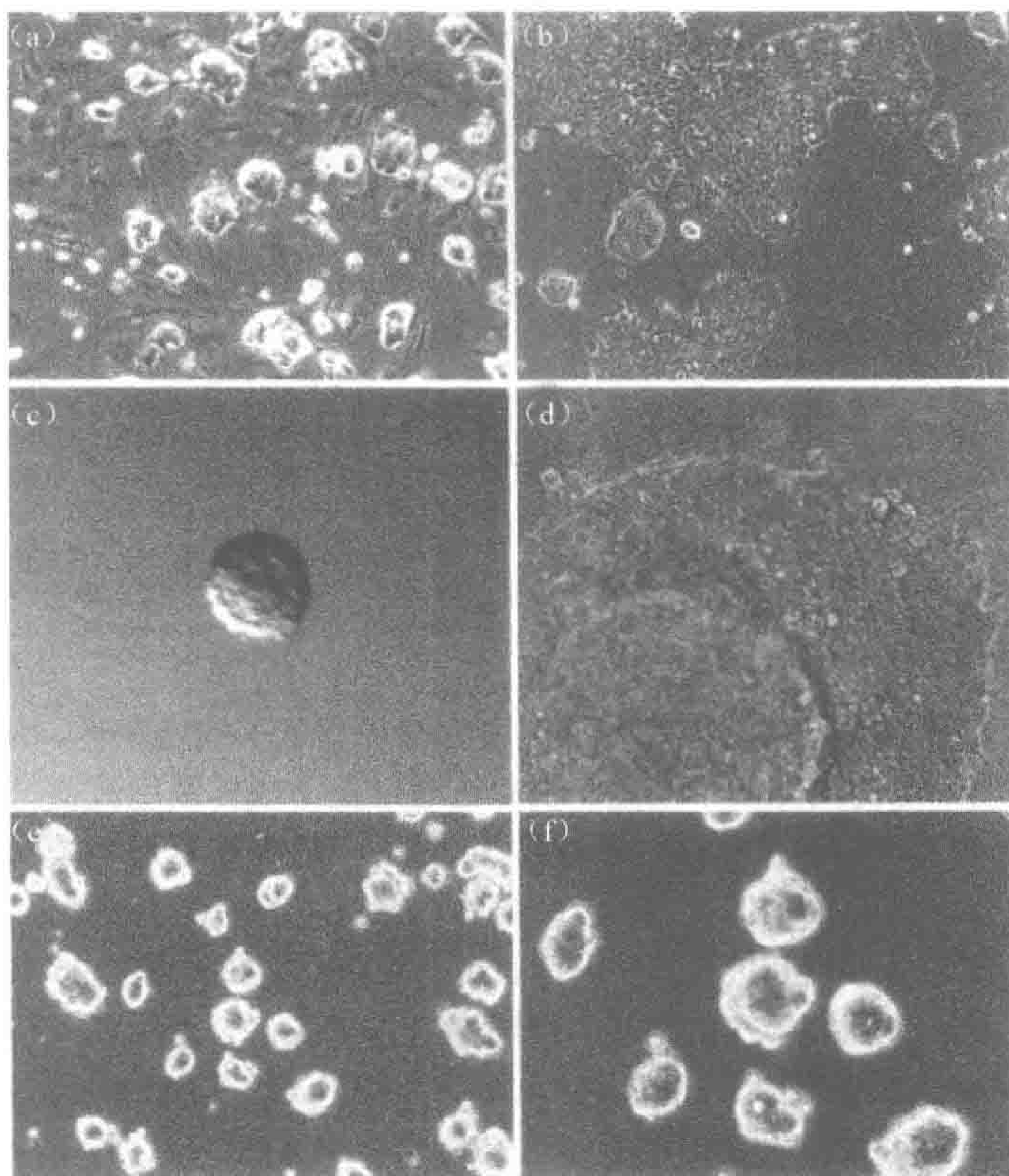
由于胚胎干细胞能够发育成不同的细胞类型（肌肉、骨、神经等），多个种属来源的但主要是小鼠来源的胚胎干细胞已经被广泛用于分化研究（Martin and Evans，1974；Martin，1975；Rizzino，2002；zur den et al.，2003）。经过动物传代的胚胎干细胞会形成畸胎瘤，类似人自发形成的畸胎瘤。生长在饲养层（如 STO 小鼠成纤维细胞）上的细胞能增殖而不分化，而当这些细胞在无饲养层的明胶上或者非贴壁的塑料皿中生长时会聚集成团，并最终分化。白血病抑制因子（LIF）可能是维持细胞处于干细胞状态的主要调节因子之一，而视黄酸类、维生素 D_3 及平面极性化合物则诱导小鼠和人谱系特异的分化（Draper et al.，2002）。

26.1.1　小鼠胚胎干细胞的诱导

小鼠胚胎干细胞培养方案 26.1-Su 见本章的补充材料。

26.1.2　小鼠胚胎干细胞的传代培养和扩增

小鼠胚胎干细胞传代方案 26.2-Su（图 26.1）见本章的补充材料。




彩版25

图 26.1 小鼠胚胎干细胞。(a) 在含血清和 LIF 且在饲养层上生长的 mES 克隆；(b) 在含血清和 LIF 条件下传代培养的 mES 细胞；(c) 分离的内细胞团（ICM），下胚层绕着上胚层生长呈“环和核”结构；(d) 培养的上胚层来源的 mES 样新生物（彩版 25a）；(e)（f）2i 培养基中生长的 mES 集落，(e) 10×，(f) 20×放大（另见彩版 25b）

26.1.3 人胚胎干细胞的原代培养

已经从人胚胎中分离培养出干细胞，可经不同的途径分化，提示其在组织修复中的应用前景（Thomson et al.，1998；Rippon and Bishop，2004）。人畸胎瘤细胞如 NTera-2（Paquet-Durand et al.，2004）、胚胎干细胞（Thomson et al.，1998）及人 EG 细胞（Schamblott et al.，1998；Turnpenny and Hanley，2007）在类似的添加 LIF、FGF-2 和毛喉素（Schamblott et al.，2002）的培养条件下扩增，具有分化能力和组织工程的重要潜能（Laslett et al.，2003；Rippon and Bishop，2004）。从 EG 培养中自发形成的类胚体来源（embryoid body derived，EBD）的培养物，经胶原酶和中性蛋白酶解聚，产生类胚体来源的细胞系更易体外传代，有更长的培养周期（Schamblott et al.，2002；Turnpenny and Hanley，2007）。这些细胞系也能够向一些不同的方向分化，有相当大的潜能可用于组织工程（Kerr et al.，2003），且具有较好的遗传稳定性（Lefort et al.，2008）。

关于美国人胚胎干细胞用于研究的使用信息见美国国立卫生研究院（NIH）网站（http://stemcells.nih.gov）。在英国，人工授精与胚胎学管理局（HFEA：www.hfea.gov.uk）授权所有分离人胚体干细胞的研究计划。

人胚胎干细胞的分离、培养和冻存方案 26.3-Su（图 26.2~图 26.4）见本章的补充材料。

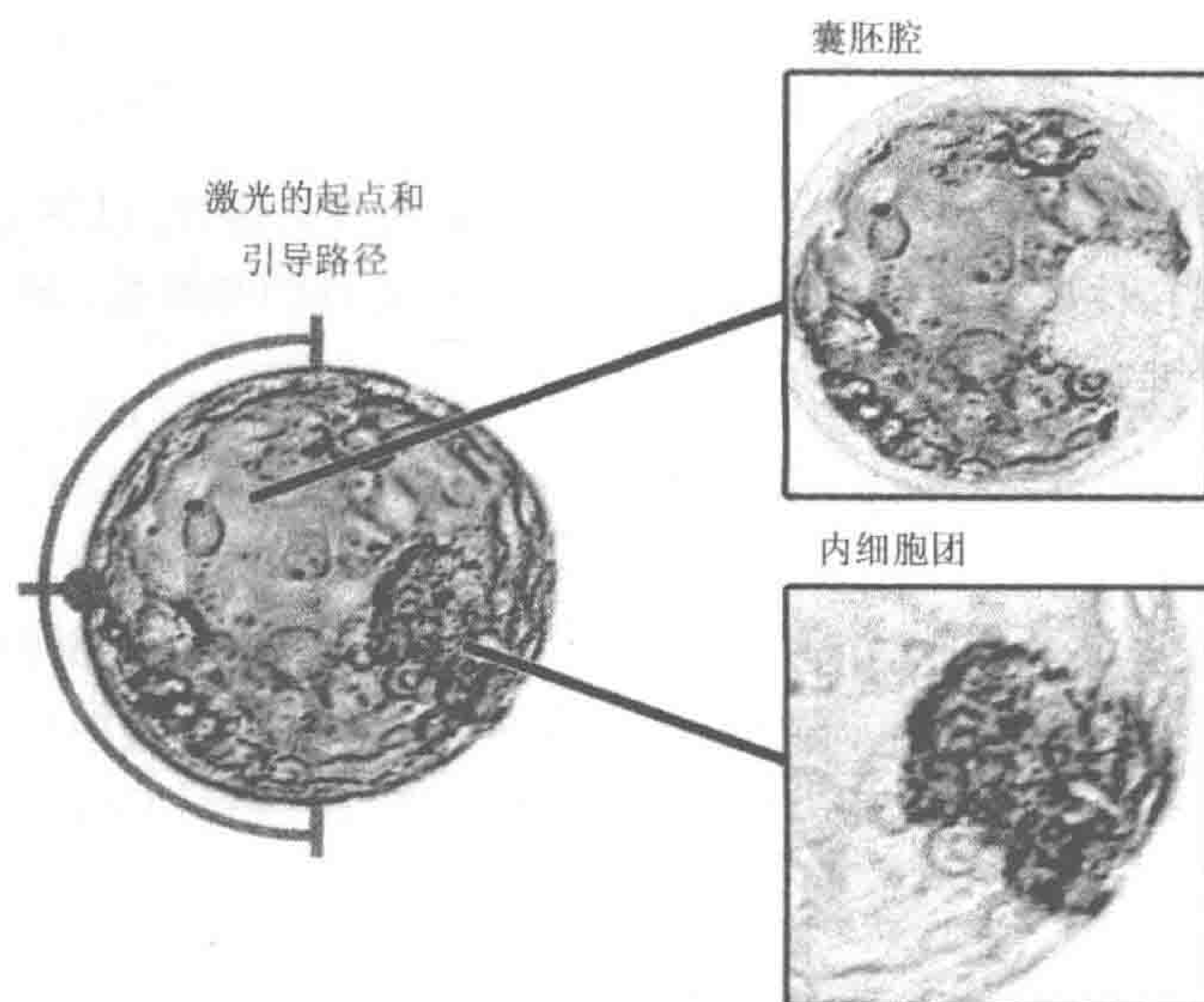


图 26.2 **囊胚分离**。激光切割分离囊胚的方法

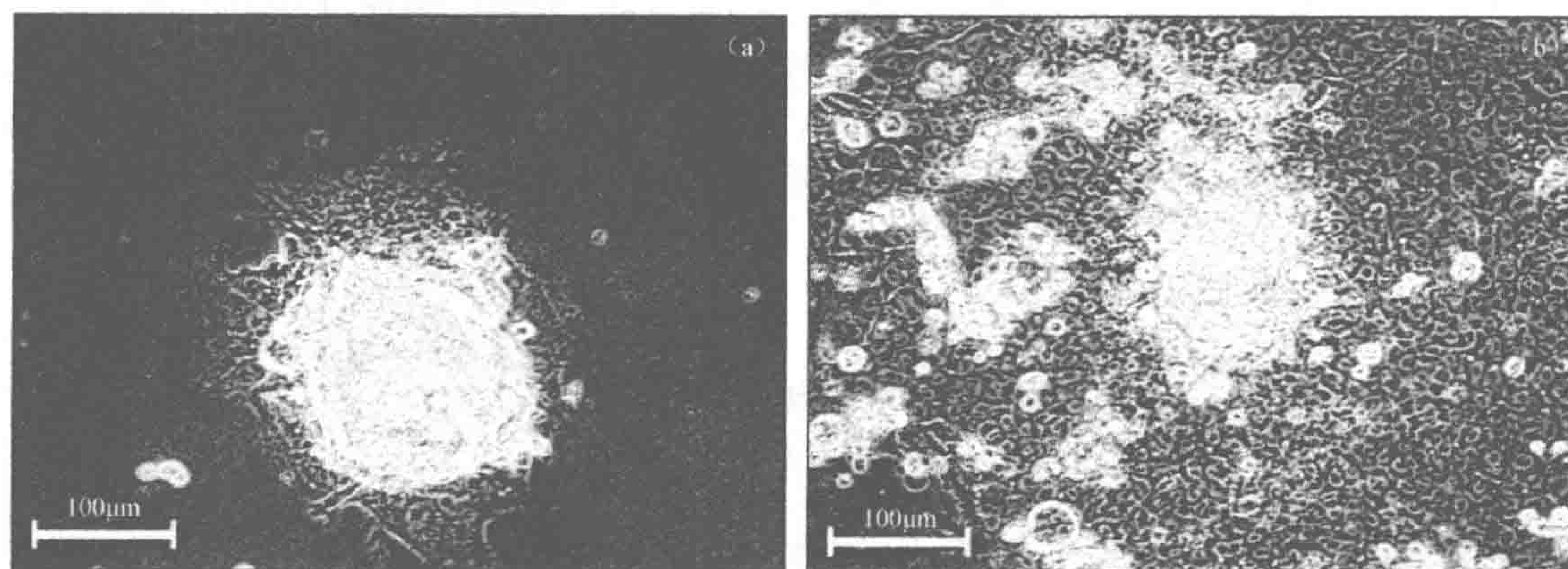


图 26.3 **游离囊胚**。塌陷的无透明带囊胚，接种后 2 天（a）和 7 天（b）

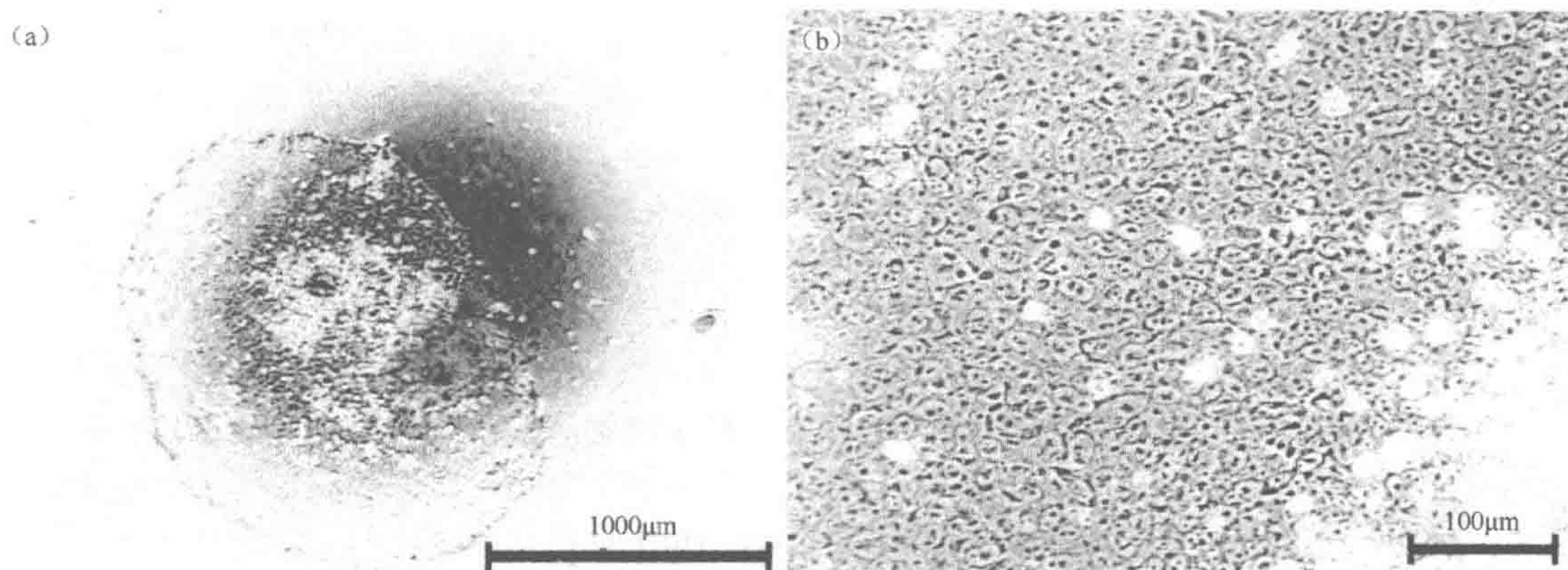


图 26.4 **人胚胎干细胞克隆**。可传代的大克隆：（a）4×物镜；（b）20×物镜

26.1.4 鱼胚胎来源的多能干细胞

除了啮齿类动物和人，多能干细胞还可从许多其他物种分离得到。以下方案介绍了原代培养，支持它们所需的饲养层细胞，以及从这些细胞得到保持全能性的细胞系。斑马鱼胚胎细胞培养方案 26.4-Su 见本章的补充材料。

26.2 生 殖 细 胞

原始生殖细胞可从原肠胚形成后的人胚胎中分离得到，生长在 STO 饲养层上（Turnpenny and Hanley，2007）。去除生长因子和饲养层后，它们能分化成一些细胞类型。能分化成所有三个胚层来源体细胞的生殖系细胞也能从成人睾丸的精原细胞中分离得到（Conrad et al.，2008）。人 ES 细胞能生成雄配子（Geijsen et al.，2004）。

26.3 胚 外 细 胞

干细胞也能从滋养层（Chung et al.，2006；Douglas et al.，2009）、胎盘（Lokesh Battula et al.，2007）和采集羊膜细胞用于产前染色体及分子分析时得到的羊水（Perin et al.，2007；Ditadi et al.，2009）中分离得到。通过转录因子 Elf5 的 DNA 甲基化分析显示滋养层细胞是区别于 ES 细胞表型的分化受限的细胞，尽管这种甲基化修饰是可调节的（Roper and Hemberger，2009）。

26.3.1 羊水细胞的培养

人胎儿核型可通过羊膜穿刺得到的羊水细胞的培养确定。

羊水细胞培养的方案 26.5-Su 见本章的补充材料。

26.3.2 从新生儿或青年来源的细胞

已经从脐带中分离得到干细胞（Sanchez-Ramos，2002；Newman et al.，2003；Howe et al.，2009）。从脐静脉回收的造血干细胞和间充质干细胞（MSC）可形成一些细胞类型，包括造血和神经胶质（McGuckin et al.，2004），MSC 还存在于围绕脐动脉和静脉的富含蛋白聚糖的基质 Wharton Jelly 中。乳牙的牙髓也含有 MSC（Sonoyama et al.，2007），其特性与骨髓 MSC 类似（参见 26.3.4 节）。脐带和牙髓是获得多能干细胞的非创伤来源，没有复杂的伦理问题。

26.3.3 成人来源的多能干细胞

已经有大量报道可以从多种成体组织分离出多能干细胞，包括骨髓（Suva et al.，2004；Gregory and Prockop，2007；Lokesh Battula et al.，2007；Ma et al.，2009）（图 26.5）、肝（Deng et al.，2003；Alison et al.，2004；Evans-Molina et al.，2009；Huch et al.，2013）、脑（Vescovi et al.，2002；Greco and Recht，2003；Rieske et al.，2009）和肌肉（Cao et al.，2003）。以前对干细胞再生的概念锁定在组织甚至是谱系特异性，从成体组织中鉴定出多潜能干细胞开启了一个完全超乎想象的干细胞生物学领域。对成体祖细胞的限定性和分化的理解激发了很多令人兴奋的前景，但也产生了一些重要的问题。如果脑内存在干细胞，为什么神经元不能再生？如果存在具有再生其他组织

潜能的循环干细胞，为什么骨骼肌来源的卫星细胞不能修复受损的心肌细胞，除非人为引入？从进化的角度，许多组织拥有的再生能力和干细胞的多能性从来没有使用过，其生物学意义是什么？干细胞能够改变其自身的分化能力的概念，即不仅是从一个谱系到另外一个谱系（例如，从卫星胶质细胞到少突胶质细胞，或者从红系到髓系），而且从一个胚层来源到另外一个胚层来源[例如，从神经外胚层到中胚层（Wurmser et al.，2004；Rieske et al.，2009）或从内胚层到神经外胚层（Deng et al.，2003）]，与已经建立的谱系分化程序的真实性有强烈的冲突，后者指许多已经报道的干细胞在异位的不规则发育是由到来的干细胞与原位祖细胞融合造成的（Alvarez-Dolado et al.，2003；Greco and Recht，2003）。尽管细胞融合可能能解释有些异位干细胞的分化，但干细胞可塑性的证据看上去也是令人信服的，尤其是成体细胞如表皮的角化细胞和真皮成纤维细胞，能够被重编程为多潜能干细胞样（参见 26.3.7 节）。成体多种组织中找到的干细胞可能从它们植入的微环境中获得它们的新潜能，而不是在它们的原位就已经是多潜能的。

用于多潜能干细胞鉴定的标记包括 NANOG、OCT4、SSEA1、SSEA3、SSEA4、PGC、hTERT、TRA-1-60、TRA-1-81（表 26.1）和碱性磷酸酶。

表 26.1 鉴定全能干细胞标记的一抗

名称	物种	公司	货号	工作液稀释
NANOG	山羊多抗	RandD Systems	AF1997	1∶20
OCT4	山羊多抗	Santa Cruz Biotechnology 公司	Sc-8629	1∶150
SSEA1	小鼠单抗	DSHB	MC-480	1∶20
SSEA3	大鼠单抗	DSHB	MC-631	1∶20
SSEA4	小鼠单抗	DSHB	MC-813-70	1∶20
PGC 表面标记	小鼠单抗	DSHB	EMA-1	1∶20
hTERT	小鼠单抗	Novocastra	NCL-L-hTERT	1∶50
TRA-1-60	小鼠单抗	Chemicon 有限公司	MAB4360	1∶50
TRA-1-81	小鼠单抗	Chemicon 有限公司	MAB4381	1∶50

资料来源：再版的 Turnpenny 和 Hanley（2007）

26.3.4 人骨髓来源间充质干细胞

研究最多的组织之一就是骨髓（参见图 26.5），从骨髓中不仅分离到造血干细胞，还分离得到具有向脂肪、肌肉、软骨、骨（Hofmann et al.，2006；Gregory and Prockop，2007）和心肌细胞（Kawada et al.，2004）等多种细胞类型分化潜能的间充质干细胞。

从骨髓制备间充质干细胞（MSC）的方案 26.6-Su 见本章的补充材料。

26.3.5 前列腺上皮干细胞

许多文献报道前列腺组织中的前列腺成球培养有利于保持细胞的自我更新能力（Reynolds and Rietze，2005；Dontu et al.，2003；Xin et al.，2007）。小鼠前列腺上皮干细胞的原代培养方案 25.7-Su 见本章的补充材料。

26.3.6 牙上皮干细胞

从小鼠切牙的颈环进行牙上皮成球培养有利于保持牙表皮干细胞的自我更新能力（Chang et al.，2013a，2013b）。小鼠牙上皮干细胞的原代培养方案 26.8-Su 见本章的补充材料。

26.3.7 诱导多潜能干细胞

迅速增加的资料显示成熟细胞可以通过转染（Nakagawa et al.，2007）改变基因表达从而转化成多潜能干细胞，这为培养的干细胞具有可塑性提供了进一步的证据。转染的方式包括可逆地使用可切割慢病毒载体（Sommer et al.，2010）（图 26.6）、piggyback 转座子（Kaji et al.，2009；Woltjen et al.，2009）、反转录病毒转染（Aasen et al.，2008；Woltjen et al.，2009）、腺病毒重编程（Stadfeld et al.，2008）、microRNA 转染（Judson and Blelloch，2009）或化学物质处理（Huangfu et al.，2008；Lin et al.，2009）。大部分诱导表达转录因子（如 c-Myc、Klf4、Oct4 和 Sox2）的方法都存在 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化的改变（Kondo and Raff，2004；Hrzenjak et al.，2006；Keenen et al.，2008；Boheler，2009）。

多能干细胞培养的方案 26.9-Su 见本章的补充材料。

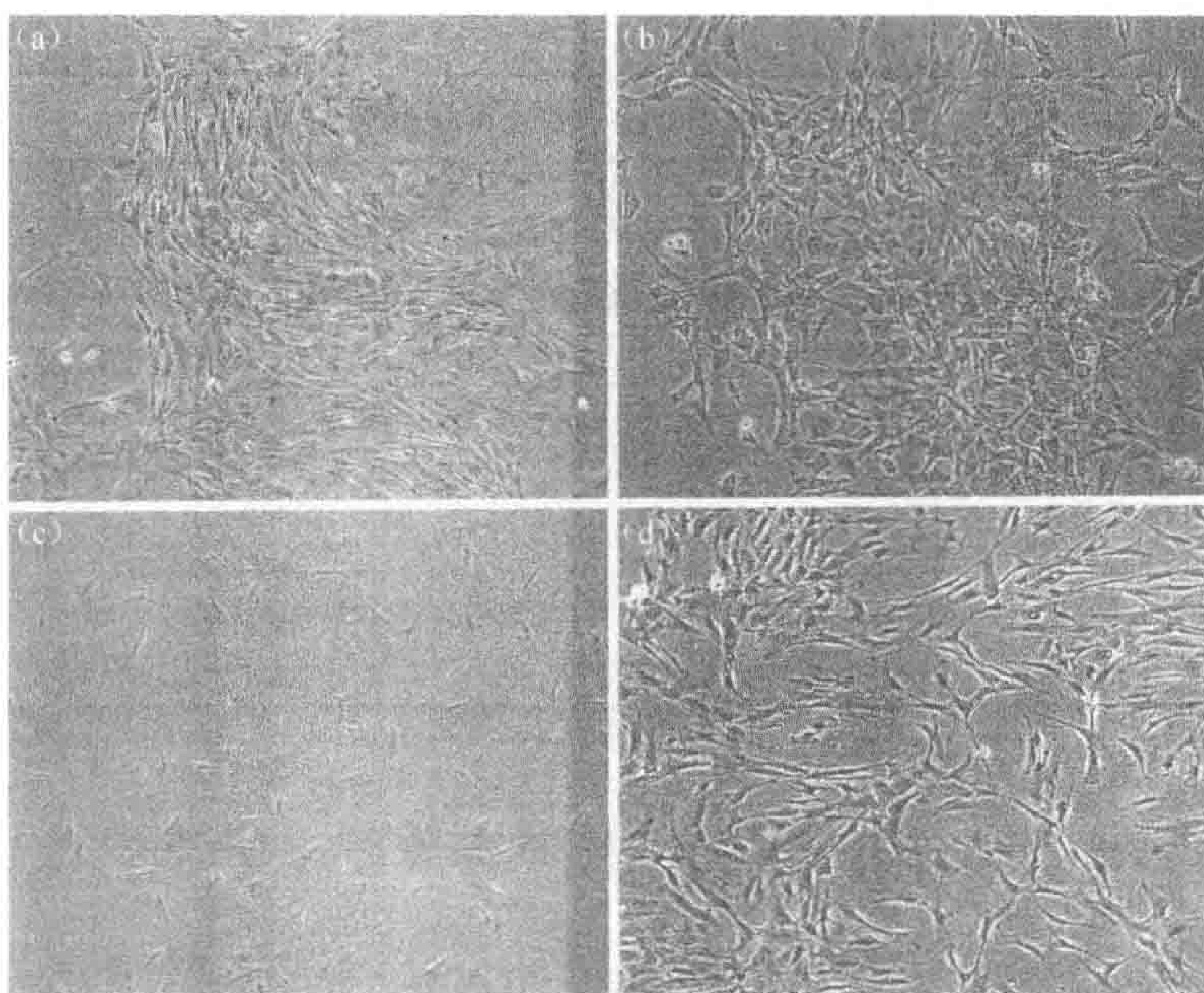


图 26.5 骨髓来源间充质干细胞。（a）（b）全骨髓单核细胞铺板后形成的集落。MSC 的形态和最佳传代密度；（c）MSC 的早期传代培养；（d）单细胞层，适合的传代密度（来自 Cregory and Prockop，2007）

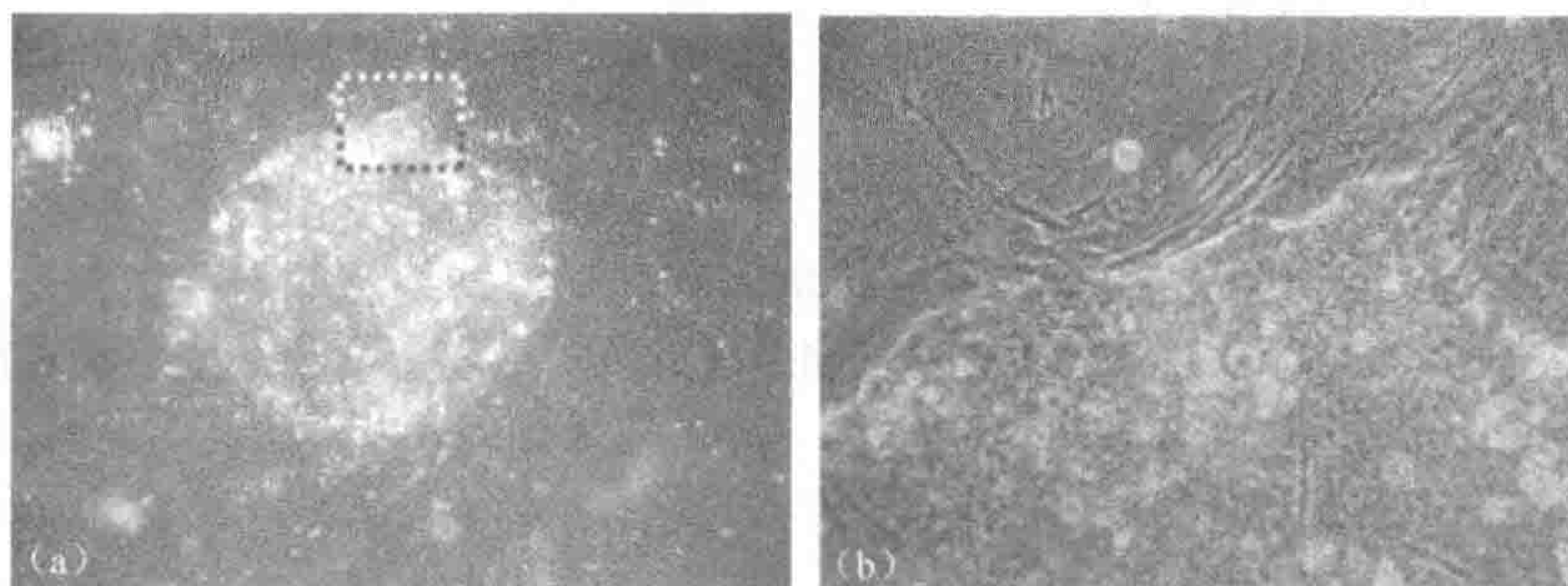


图 26.6 iPS 细胞集落。感染 25 天后典型的 iPS 集落。（a）暗区，低倍放大；（b）用虚线圈出的集落边缘的高倍放大

26.4 造血干细胞

琼脂或甲基纤维素集落形成实验的发展，生长调节因子的发现，特异性细胞表面标记分子的鉴定，以及集落细胞体内脾集落形成能力的评价，使造血系统成为干细胞鉴定及确定其在组织发育中的作用方面研究的引领者。这是一个复杂的但已经很好地被分层鉴定的细胞群体，从某种程度上说促进了其他组织的干细胞鉴定。造血调控的综述参见短篇综述 26.1 和图 26.7。

短篇综述 26.1 培养过程中造血细胞的生长调控*

造血干细胞（hemopoietic stem cell，HSC） 是多能干细胞，负责持续地生产和分化成所有成熟淋系和髓系血细胞，包括红细胞、白细胞和血小板（图 26.7）。胚胎阶段的 HSC 位于卵黄囊和胎肝。成人 HSC 位于骨髓龛位中，保持静息状态，受到刺激后通过对称和不对称分裂进行分化或自我更新，维持 HSC 池。HSC 也经历凋亡。调控 HSC 命运的信号通路非常复杂（图 26.7），包括细胞内源和外源的因素，最终取决于 HSC、骨髓基质细胞、龛位其他组分和交感神经系统这些因素的相互作用。HSC 是骨髓中数量非常小的细胞群体，在成体中的比例低于十万分之一（Harrison et al.，1990），但它们独特的自我更新能力使其保持永生。HSC 已经证实是临床上有重要意义的细胞群体，通过自体和异基因移植用于治疗，还有少量用于基因治疗。HSC 范畴内出现的疾病，例如，BCR-ABL1 驱动的慢性髓系白血病，所引发的白血病干细胞（leukemic stem cell，LSC）与正常 HSC 相似，可维持在静息状态，对传统的化疗和靶向药物耐药，使疾病难以根治。因此 HSC 的研究对肿瘤研究方面也非常重要。

HSC 来源 胚胎时期可以从胎肝或者脐带血分离到 HSC 并可用于研究。脐带血用于治疗的关键局限性是干细胞数量，一次移植通常需要来自两个甚至更多的供者。成人 HSC 可以通过骨髓采集，也可通过粒细胞集落刺激因子将骨髓中的 HSC 动员到外周血中，从外周血收集得到（参见图 17.6）。从人胚胎干细胞和 iPS 细胞诱导产生 HSC 也在广泛研究中，但这些技术的临床应用还处于非常早期阶段，还需要持续了解这些产品的全面性状和安全性（Hole，1999）。不同组织来源的 HSC 的比例差异非常大。HSC 本身也存在功能上的差异，例如，它们的归巢能力、移植能力，以及最重要的在异基因移植中它们的免疫原性和诱导移植物抗宿主病的可能性（Sirinoglu et al.，2012）。

HSC 的鉴定 HSC 鉴定的金标准是在移植中自我更新的功能评价。真正的长期 HSC，移植到合适的预处理过的受体中，可以再生受体的血、骨髓和免疫系统。

造血干细胞不表达任何分化细胞的是特征性标记分子（lineage markers，Lin^-）。不同表型的表面标记分子，如 $CD34^+$（Civin et al.，1984），$CD38^{low/-}$（Terstappen et al.，1991），$Thy1^+$（Baum et al.，1992），Rho^{low}，$CD49f^+$（Notta et al.，2011），$CD133^+$（Yin et al.，1997），$CD45RO^+$，$CD45RA^-$（Lansdorp et al.，1990），$CD59^+$（Hill et al.，1996），$CD109^+$（Murray et al.，1999），$c\text{-}Kit^{-/low}$（Gunji et al.，1993），$CD166^+$（Uchida et al.，1997）和 HLA $DR^{low/-}$（Srour et al.，1992）（表 26.2），已经全部用于 HSC 鉴定，但没有一个被研究者完全接受。即使是接受程度最高的标记分子 $CD34^+$也在研究中被争论（Bhatia et al.，1998；Anjos-Afonso et al.，2013）。HSC 也

* Arunima Mukhopadhyay 博士和 Tessa L Holyoake 教授撰写，格拉斯哥大学，癌症科学研究所，Arunima. Mukhopadhyay@glasgow.ac.uk。

可以根据其具备排出活体染料的能力获得富集，如罗丹明123（Udomsakdi et al., 1991），Hoechst 33342和派洛宁Y（Ladd et al., 1997）。原始细胞可以基于这些标记分子组合的阳性选择或细胞表达的谱系分子的阴性选择，通过流式和（或）免疫磁珠进行鉴定和分离。广为接受的体外鉴定原始多能HSC的最严谨的方法是长期培养起始细胞（long-term culture-initiating cell，LTC-IC）

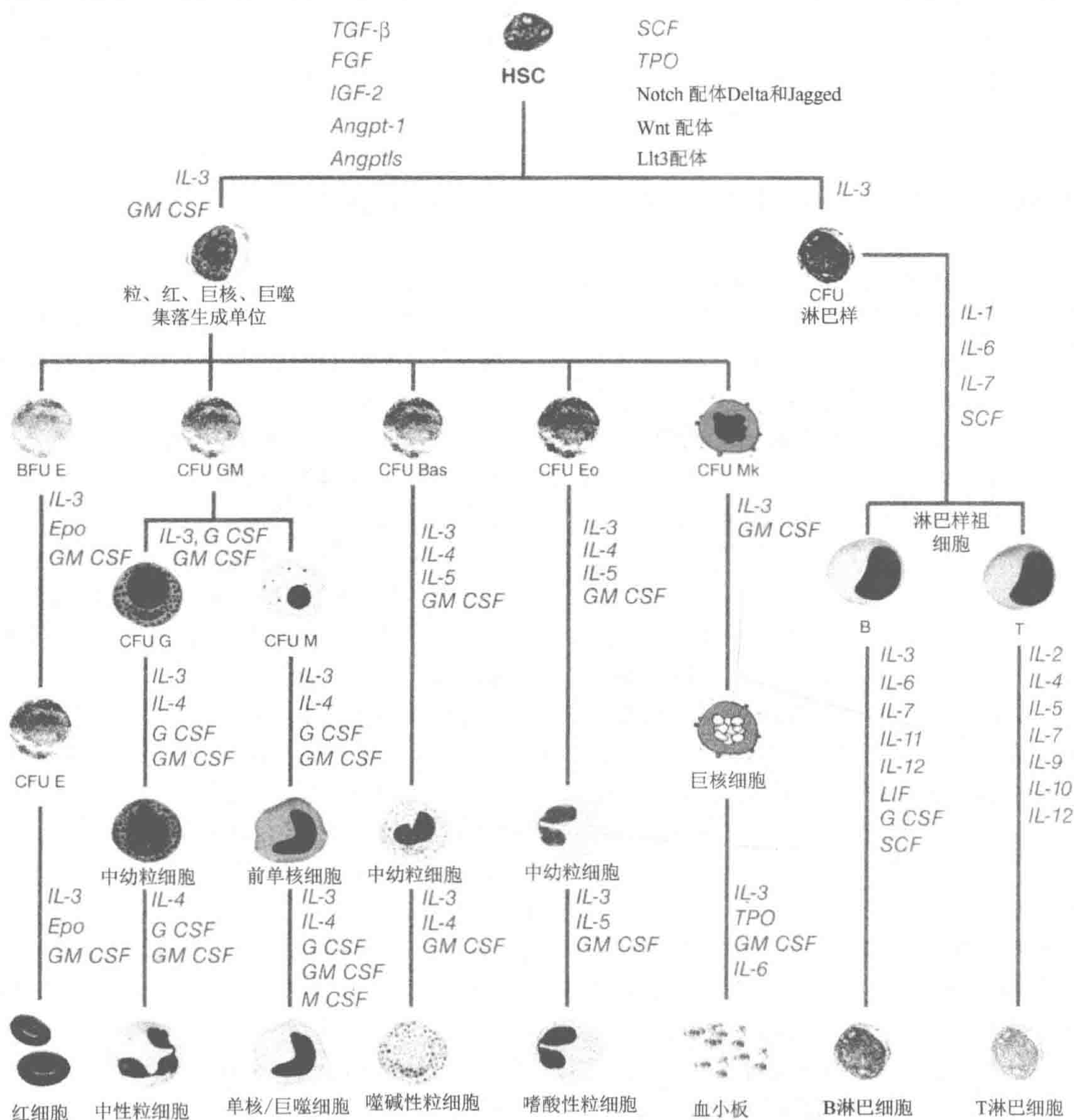


图26.7 造血过程中的细胞因子。造血不同阶段所涉及的主要造血因子（缩写：Angpt=血管生成素；Angptls=血管生成素样蛋白；BFU E=红细胞爆裂型集落生成单位；CFU E=红细胞集落形成单位；CFU M=单核/巨噬细胞集落形成单位；CFU=集落形成单位；Epo=红细胞生成素；FGF=成纤维细胞生长因子；G CSF=粒细胞集落刺激因子；GM CSF=巨噬细胞集落刺激因子；HSC=造血干细胞；IGF=胰岛素样生长因子；IL=白介素；LIF=白血病抑制因子；M CSF=单核/巨噬细胞集落刺激因子；CSF=干细胞因子；TGF-β=转化生长因子β；TPO=血小板生长因子）（由 Arumina Mukhophdyay 和 TESSA Holyoake 提供）

分析（参见方案 26.10-Su）。根据起始材料的不同，LTC-IC 的比例的变化范围不同，在全组分的成体骨髓中为 0.005%~0.005%，在 $Lin^-CD34^+CD38^-$ 成体骨髓中为 15%~30%，在 $Lin^-CD34^+CD38^-$ 脐带血干细胞中为 20%~50%（Bunting，2008）。尽管目前表面标记分子还不能精确地鉴定纯 LTC-IC 群体，但它们对富集起始材料以提高数量极少的长期多能 HSC 的检测有非常重要的帮助。

表 26.2 造血干细胞表面标记分子

表面标记分子	状态	参考文献
CD34	表达	Civin et al.，1984
CD45RO	表达	Lansdrop et al.，1990
CD45RA	不表达	Lansdrop et al.，1990
CD38	低或不表达	Terstappen et al.，1991
Thy1	表达	Baum et al.，1992
HLA DR	低或不表达	Srour et al.，1992
C-Kit	低表达	Gunji et al.，1993
CD59	表达	Hill et al.，1996
CD133	表达	Yin et al.，1997
CD166	表达	Uchida et al.，1997
CD109	表达	Murray et al.，1999
Rho	低表达	Notta et al.，2011
CD49	表达	Notta et al.，2011
罗丹明 123	排出	Udomsakdi et al.，1991
Hoechst 33342	排出	Ladd et al.，1997
派洛宁 Y	排出	Ladd et al.，1997

短期 HSC 或祖细胞的增殖潜能可以被用来识别这些细胞，它们能在半固体培养基形成集落。通常所用的方法是成集落能力分析，称为集落形成细胞（Colony-forming cell）分析（参见方案 26.10-Su）。

HSC 的生长 长期 HSC 的体外生长是一个挑战。这些细胞需要在扩增的同时保持不分化和凋亡，这需要细胞内外因素的复杂环境。根据骨髓龛位中的发现，外因可以通过照射后的基质细胞作为滋养层来提供。受控的辐射暴露是必需的，用于保持滋养层细胞是活的但已停止增殖。长期培养起始细胞（LTC-IC）分析也遵循这个原则，HSC 生长在基质细胞上，经小鼠滋养层组织工程改造后生产人造血因子。血清是合格滋养层建立所必需的，皮质类固醇对维持长期培养也是必需的。

长期培养起始细胞（LTC-IC）分析 人细胞因子的特异组合对 HSC 的扩增是必需的，这个组合方案尚无定论，尽管 IL-3 和 G-CSF 的联合使用被广泛用于 LTC-IC 分析。M210B4 成纤维细胞是 C57BL/6J×C3H/HeJ F1 小鼠来源的，通过组织工程基因改造能产生人 IL-3 和 G-CSF，已经证实能在体外支持人髓系造血生成。加入干细胞因子（stem cell factor，SCF），由 S1/S1 小鼠来源的重组 S1/S1 基质细胞系通过基因改造生成人的 IL-3 和 SCF，已经证实能提高长期 HSC 的维持（Hogge et al.，1996）。两种不同的 LTC-IC 培养方法都有实际应用。大量细胞的 LTC-IC 分析是用于样品中 ITL-IC 的计数，而有限稀释分析（limiting dilution analysis，LDA）是用于单个 HSC/LTC-IC 效力或增殖潜能的量化。

培养周期也非常重要，因为更多成熟的祖细胞将随着时间被清除，纯的长期 LTC-IC 群体可以在延长 LTC-IC 分析的终末被分离出来。最初的分析时间是 35~60 天（5~8 周）（Sutherland et al.， 1989，1990），可以延长到 100 天进行延长 LTC-IC 分析（Hao et al.，1996），后者被认

为能检测到更多的具有更高增殖潜能的静息状态的原始的 HSC。

LTC-IC 计数 LTC-IC 在滋养层下可产生鹅卵石样的集落，这些作为 LTC-IC 检测的可视终点，可被计数为鹅卵石样形成细胞（cobblestone area-forming cell，CAFC）（Breems et al.，1994）。LTC-IC 检测最常用的终点是二次培养通过 CFC 分析祖细胞形成。收集原代滋养层培养物，回收的细胞接种到含有细胞因子鸡尾酒的半固体甲基纤维素培养基二次培养物中，培养 10~14 天，每个 LTC-IC 来源的祖细胞可以产生一个 CFC 集落。造血因子（IL-3、G-CSF 和 SCF）是集落形成必需的，其他细胞因子包括红细胞生成素（Epo）、GM-CSF 和 IL-6，单一或组合的加入可以促进髓系分化和粒细胞、红细胞、巨噬细胞和巨核细胞的集落形成。这些集落被定量用于原代培养 LTC-IC 的读数。不同来源的 LTC-IC 的集落形成能力会有变化。每个 LTC-IC 变化的范围从骨髓的 24 个 CFC 到胎肝的 90 个 CFC（Liu et al.，2014）。

所有这些上述的分析都必须驱动髓系的增殖。在 AFT024 胎肝基质细胞上培养骨髓 HSC，同时加入 Flt3-Ligand、SCF 和 IL-7，可能诱导髓系和淋系的共同增殖。这种髓系淋系起始细胞（ML-IC）分析对坚持细胞的多系分化潜能是非常有用的（Punzel et al.，1999）。OP9-DL1 细胞是骨髓来源的基质细胞，异位表达 Notch 配体 Dll1（delta-like 1），可支持 T 淋巴细胞的生长（Holmes and Zuniga-Pflucker，2009），而小鼠基质细胞 MS-5 在没有外源人细胞因子时可生成 B 淋巴细胞系（Beradi et al.，1997）。

HSC 的无滋养层培养 过去的几年很多细胞因子的鸡尾酒被推荐用于体外 HSC 的体外无滋养层的液体培养。无血清或含血清培养基，补充细胞因子组合（如 SCF、血小板生成素、Flt-3 配体、IL-11、IL-3、IL-6），以及许多发育调节分子和化学调节分子，已经被研究是否能用于移植的 HSC 扩增。这些培养方法在培养基的补充物、周期和扩增的差异已经被多次综述（Sauvageau et al.，2004；Walasek et al.，2012）。发育相关因子如 FGF-1、IGF-2、巨核细胞生长和发育因子、血管生成素样 5，以及 IGF 结合蛋白 2（IGFBP2）（Zhang et al.，2006；Huynh et al.，2008）用于提高扩增水平是可行的。即使有了大量研究，目前还不能在体外超过延长周期的维持扩增 HSC。用化学调节分子，祖细胞群体的扩增数量能提高 9500 倍（Boitano et al.，2010），但 HSC 的扩增尚未达到最优。

结论 造血系统中，多能 HSC 是移植和肿瘤研究中最重要的细胞。用多种细胞表面标记分子组合分离原始细胞，随后进行 LTC-IC 分析，可以鉴定长期 HSC 群体。在不同 HSC 来源中，LTC-IC 的频率是变化的，如骨髓、脐带血或者动员的外周血。细胞因子环境掌握 HSC 体内和体外的命运。用于 HSC 鉴定的基于基质细胞的体外培养系统已经成熟。长期 HSC 领域要建立无基质培养尚未完善，但祖细胞扩增已经可行。用于长期 HSC 鉴定的金标准是它能够在预处理的受体内实现血液、骨髓和淋巴器官重建的功能。

26.4.1 小鼠骨髓长期培养

关于小鼠骨髓的研究已经证实，在软琼脂中能形成集落（Heyworth and Spooncer，1992）或体内脾集落形成（Till and McCulloch，1961）的干细胞在骨髓基质细胞接触获得合适的相互作用，就可以扩增超过几周（Dexter et al.，1984；Spooncer et al.，1992）。

26.4.2 人骨髓长期培养

已经证实人骨髓来源的集落形成培养物能在照射后基质滋养细胞中增殖（参见短篇综述

26.1）。这些长期培养起始细胞 LTC-IC 可以维持几个月。方案 26.10-Su 人长期培养的起始细胞 LTC-IC 分析在本章的补充材料中可见。

26.5 再生医学中干细胞的应用

干细胞培养、未分化状态下的扩增和分化，包括体内和体外，对基础发育生物学和再生医学带来很多潜在的用处。短篇综述 26.2 介绍了干细胞在再生医学中的应用。

短篇综述 26.2 基于细胞的再生医学*

再生医学的概念 干细胞是克隆性增殖、自我更新、功能上原始的细胞，具有分化为几种或所有器官功能细胞类型的能力（参见第 19 章）。它们是整个生命所有阶段多细胞器官的必要组成成分，尽管在胚胎和胎儿时期干细胞的目的是初始发育和生长，它们在成体中担负着再生功能。事实上，在成体中几乎所有的组织的自然修复过程通常是通过干细胞群体的作用实现的（Monti et al.，2012），为了实现这个功能，干细胞通常位于离散结构或龛位中，紧密调节其自我更新和分化（Scadden，2014；Schofield，1978；Rezza et al.，2014）。我们固有的修复能力对存活是必需的，人类的干细胞是有限的，因此它们向特定细胞类型分化的能力是有限制的。这表现在我们不能再生复杂的器官和肢体，这个有限性通常会阻碍从严重创伤或疾病中得到恢复，尽管很多低等脊椎动物拥有这些能力（Simon and Tanaka，2013；Monaghan and Maden，2012）。

幸运的是，现代组织培养技术已经使人细胞体外大量获得成为可能。在过去的 30 年中，这些进步带来再生医学领域的快速发展，再生医学是指在细胞水平替代或修复缺失或损伤的组织（NIBIB; NIH Regenerative medicine，2006）。

随着成体组织中多种干/祖细胞群体的发现（Grompe，2012；Raveh Amit et al.，2013），胚胎干细胞（Martin，1981；Evans and Kaufman，1981；Thomson et al.，1998）和细胞重编程技术的出现（Takahashi and Yamanaka，2006；Takahashi，2014），再生医学上涌现了大量针对损伤或病变组织的修复的策略。经典模式中，具有分化为靶组织潜能的干细胞通过体外分离，培养扩增到达临床需要的细胞，然后移植到病变组织。干细胞探测周围组织的情况，分化成所需要的细胞类型。有些方法还依赖于移植前体外干细胞的分化。过去的 10 年，干细胞介导的组织修复的其他机制被发现，干细胞和相关细胞类型不是通过细胞替代而是通过旁分泌作用修复组织。在这种情况下，移植的细胞产生生长因子，免疫调节因子和抗凋亡因子增强受体固有的组织修复机制。这些所谓营养效应部分解释了为什么干细胞短暂的植入能够带来显著的效应（Caplan，2007，2009）。最新的有潜力的再生医学策略是由 Takahashi 和 Yamanaka（2006）推出的细胞重编程方法。在这个方案中，通过过表达重置染色体表观遗传学状态的转录因子将完全分化的成体细胞重编程为干细胞样表型。重编程细胞或所谓的诱导多能干细胞（iPSC）可进一步分化成所需的组织。总之，这些技术为再生医学提供了大量的方法（图 26.8）。

干细胞可塑性的等级 复杂的多细胞器官是从一个受精卵形成开始发育的，因而经历了连续的细胞分裂，形成一个细胞球，也称为囊胚。囊胚由空心球（也称为滋养层，随后发育成胎盘）和内细胞团（最后生成胚胎所有组织细胞）组成。在胚胎发育过程中，内细胞团经过了连

---

*由 C. A. Gregory，Instiute for Regenerative Medicine at Scott and White Hospital，Texas A and M Health Science Centre。cgregory@medicine.tamhsc.edu.提供。

续分裂并伴随多级分化。经过显著的重塑期也称为原肠胚形成，最后内细胞团的细胞形成胚胎的胚层，即内胚层、外胚层和中胚层。原肠胚后，一般认为每个胚层的干细胞只能定向生成来源胚层的组织。随着组织发育，胚层中的干细胞进一步限定，发育的可塑性下降而定向分化成组织特异性细胞类型的能力提高。因此，干细胞在发育过程中逐渐失去可塑的范围，而与所在的成体组织更相容。例如，干细胞根据分化潜能可大致被分类，最终建立了可塑性的等级（Smith，2006）。全能细胞是指能够生成所有已知细胞类型的细胞，包括内细胞团和滋养层。这些细胞最好的例子是受精卵及它非常早的后代。多能细胞（pluripotent cell）是指能够形成所有发育胚层来源的组织和干细胞，但没有直接分化成滋养层的能力。这些细胞最好的例子是内细胞团。多能细胞（multipotent cell）是指能分化成限定在一个指定的胚层的多种组织。间充质干细胞（MSC）是多能干细胞（multipotent stem cell）最好的例子，能够产生中胚层来源的组织，包括骨、肌腱、脂肪和软骨。最后具有分化成有限的细胞类型或者是一种细胞类型的细胞被称为祖细胞、寡能细胞或单能细胞。

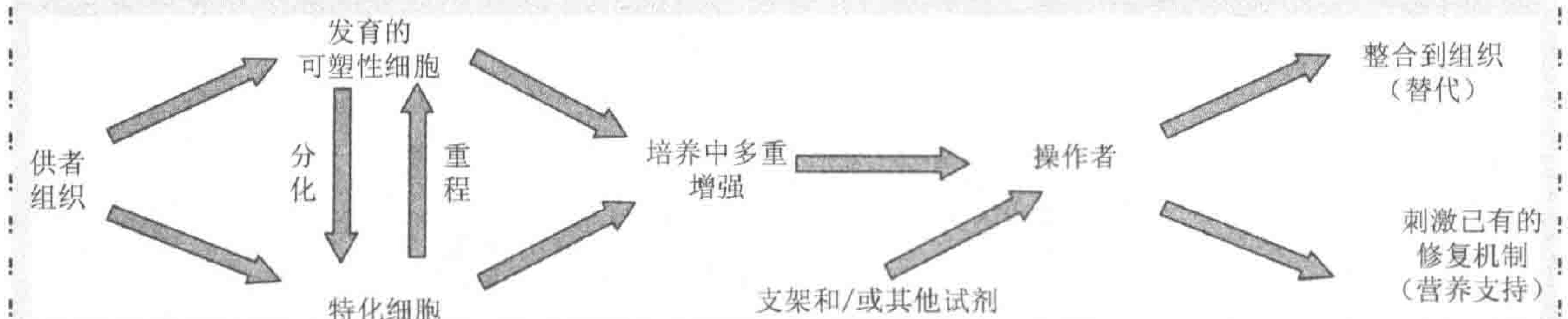


图 26.8 再生医学示例

胚胎干细胞 胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）是从囊胚的内细胞团制备的多能细胞（pluripotent cell）（Thomson et al.，1998）。ESC 在适当的调节下可以产生克隆，保持多能性，分裂并无衰老，在理论上是一个可以无限提供的生物材料。这通常是在成纤维细胞滋养层存在下或含有复杂生长因子、化学分子和细胞外基质的混合物培养体系下获得（Cooke and Minger，2007）。胚胎干细胞具有自发形成分化细胞的聚集体即类胚体的趋势，因此其培养还是一个挑战。不合适的扩增和分化问题在体内也存在，会形成包含多种组织类型的良性生长物即畸胎瘤。因此 ESC 在医学的应用潜能与畸胎瘤形成的危险（Atala，2012）和直接针对分化的 ES 细胞的免疫反应（Bifari et al.，2010）的担忧密切相关。还有使用流产的人囊胚相关的重要伦理问题。然而，已经有证据显示移植前 ESC 彻底的分化和注意细胞剂量可充分降低健康风险（Atala，2012）。因此，ESC 已经在临床前疾病模型中进行评价，也开展了部分人的临床试验（Atala，2012）。

诱导多能干细胞 诱导多能干细胞（iPS）来自分化的成体细胞，这些成体细胞内上调转录因子可导致表观染色体修饰的缺失。这样从根本上把细胞重置到原始状态，从而可以再分化成其他限制性细胞类型。最初，iPS 是通过反转录病毒介导 Sox2、Oct3/4、Klf4 和癌基因 *c-Myc* 而产生的（Takahashi and Yamanaka，2006）。自从 2006 年首个方案报道后，不同组织和物种的 iPS 被成功诱导，使用的诱导技术不再导致转染基因永久的基因组整合（Yu et al.，2009）。由于 iPSC 是多能干细胞且可无限扩增，它们在培养中会形成类胚体，在受者体内会形成畸胎瘤。但伦理和免疫学问题解决了，因为患者是 iPSC 的理论上的组织供者。由于 iPSC 的遗传修饰操作易行，因此它们在纠正遗传病方面有很大的可能。例如，在一个开创性研究中，小鼠的镰状细胞性贫血的突变通过自体来源的 iPSC 随后分化成造血干细胞而得到纠正（HSC；见短篇综述 26.1）。当遗传纠正的造血干细胞重新移植回受体小鼠的脊髓中，造血干细胞可以产生

功能正常的血细胞，贫血就得到纠正（Hanna et al.，2007）。尽管iPS细胞用于人的治疗尚处于实验阶段，但它们已经成为研究不同的人类疾病模型的必要工具（Colman and Dreesen，2009）。这最终有益于对复杂的人类疾病有更好的了解，并为细胞治疗提供策略。

成体干细胞 成体干细胞（ASC）来源于完全发育成熟的组织，通常被认为是多能干细胞，能产生它们来源胚层的细胞类型，早期研究显示有些来源的成体干细胞有能跨越发育界限的共性（Theise and Krause，2002），但随着技术的发展，现在认为很多观察到的现象是由于试剂和方案的局限性，甚至是细胞融合事件所造成的（Theise，2005；Prockop，2009；Gruh and Martin，2009；Bianco et al.，2013）。此外，最近的研究中有些研究组非常令人信服地证明：很少有组织中的成体干细胞具有多能（pluripotent）分化的能力（Wakao et al.，2011；Roy et al.，2013）。介绍所有已知类型的成体干细胞的内容超出了本综述所涉及的范围，这些细胞具有一些共同的基本特性（Monti et al.，2012；Grompe，2012；Raveh-Amit et al.，2013）。例如，与ESC和iPSC不同，成体干细胞不能无限分裂，在连续几次扩增后，会出现增殖衰老（Larson et al.，2010）。因此，成体干细胞的产量取决于组织的获取情况，一些关键特性如增殖、分化潜能等随供者而变化（Phinney et al.，1999）。成体干细胞不会形成畸胎瘤，也不可能在受者体内形成肿瘤，除非培养中随连续的有丝分裂出现转化或是癌基因出现遗传学改变。自体来源的成体干细胞不会引发免疫反应，但有些免疫学不匹配的异基因供者来源的成体干细胞会有免疫反应。造血干细胞受者中出现的移植物抗宿主病就是最好的例子（Abo-Zena and Horwitz，2002）。相反的，有些成体干细胞具有显著的免疫调节特性，在异基因受者体内具有一定程度的免疫豁免。例如，间充质干细胞能够抑制免疫系统的很多方面，因此可以延长植入时间，能够调节不同的炎症和自身免疫反应。这些特性使得间充质干细胞在治疗慢性自身免疫性疾病如克隆氏病、关节炎，甚至是糖尿病中获得关注（Abumaree et al.，2012）。尽管间充质干细胞可以从多种组织中获得，但最早是从骨髓和脂肪组织中分离培养的。它们能够分化成多种结缔组织，包括骨和软骨，因此在整形外科中的应用有巨大的潜能（Caplan，2005），并且能够通过分泌营养因子促进组织修复，故在导致组织坏死的疾病治疗中有很好的应用，包括休克和心肌梗死（Caplan，2009；Prockop et al.，2010；Prockop and Oh，2012）。

给药方式 细胞移植给受者可以通过系统给药或者直接移植到损伤或疾病的部位。在系统给药中，细胞通常是在损伤组织发出的损伤信号指引下通过血液迁移（或者在有些情况下是通过淋巴系统或脑积液）到合适的部位。

直接组织给药，即干细胞通常与细胞基质或材料结合植入到合适的部位，使其存留、保持活性并分化成所需要的组织类型（Garg et al.，2012；Demirbag et al.，2011；Stoltz et al.，2006）。通常还作为支架的一部分或者以可溶性形式一起给药，进一步促进分化。在组织工程中，细胞、支架和生物活性剂联合是非常经典的方式（Vacanti and Langer，1999；Langer and Vacanti，1993），而单独给细胞被认为是细胞治疗（Mason et al.，2012）。

无论是直接给药还是系统给药，干细胞都可能通过直接分化形成功能细胞或分泌营养因子促进组织的修复能力，来参与组织的修复。

结论 再生医学领域的定义是细胞水平缺失或损伤组织的替代和修复。这个经典的过程包括将干细胞移植给受者，它们之间分化成靶组织或通过旁分泌或营养作用支持自然的修复过程。干细胞可以来自胚胎或成体组织，还可以来自重编程分化的细胞回复干细胞样阶段。根据应用，治疗的细胞可以单独移植（细胞治疗）或结合到模拟靶组织特性的支架上（组织工程）。大部分这些方法都还在研发试验阶段，有些已经转化到临床试验。这个行业领域的快速发展显示出再生医学将在不久的将来对未来医学产生有益的影响。

26.6 肿瘤干细胞

癌症的干细胞来源一直是这些年的热点，干细胞群体通常被认为是治疗后复发的主要群体，因此是化疗的主要靶点（Hamburger and Salmon，1977；Vermeulen et al.，2008；Dick，2009），尤其是一类基因相关的耐药，ABC 转运蛋白，在干细胞上表达（Robey et al.，2009）。现在干细胞的标记分子已经比较清晰，主要的研究结果集中在乳腺（Pontier and Muller，2009）、前列腺（Hurt et al.，2008；Kasper 2008）、头颈部（Graziano et al.，2008）和脑（Vescovi et al.，2002）的肿瘤干细胞。因此，受到最近正常干细胞的培养（参见短篇综述 26.1~26.3）和特异性标记分子建立方面（Beck and Blanpain，2013）的进展激发，研究人员对分离和鉴定肿瘤干细胞方面（Dick，2009）热情高涨，包括前列腺癌（Kasper，2008）、胶质瘤（Pollard et al.，2009；Kang et al.，2014）、头颈部肿瘤（Graziano et al.，2008）。这个领域最新状态参见短篇综述 26.3。

短篇综述 26.3 肿瘤干细胞培养*

肿瘤干细胞（cancer stem cell，CSC）是公认的具有自我维持能力和产生组成肿瘤的多种细胞能力的肿瘤细胞亚群。肿瘤干细胞已经证实是耐药、转移和复发的细胞基础。由于多种不同作用，肿瘤干细胞被认为是肿瘤治疗的重要靶标。在细胞培养体系中研究肿瘤干细胞的可行性面临很多挑战。

肿瘤干细胞的来源 肿瘤干细胞的大部分研究都是用肿瘤细胞系进行的，这些细胞已在塑料培养皿中用高糖和含血清的培养基经过多次传代，筛选出来的细胞表型和体内细胞的表型已经很少一致了。此外，这些高度选择性条件还可以增加细胞系的遗传学不稳定，甚至比体内的肿瘤细胞更加不稳定，这就增加了再现性的困难（Van Staveren et al.，2009）。

患者来源组织是研究肿瘤干细胞的最佳选择，但材料的获取是有限的，几乎不能在不同实验室重复实验。细胞特性明确的原代细胞培养是一个合理的折中办法，细胞就在定义好的条件下扩增（Labarge et al.，2013）。细胞系的培养条件需要进一步优化以维持遗传稳定性，并且需要比较体内和培养条件下细胞的表观遗传学状态，以确定细胞顺应培养环境作出多大的改变（Bentivegna et al.，2013）。

肿瘤干细胞的分离 任何肿瘤类型来源的肿瘤干细胞尚未有明确的生化表型，因此鉴定一个富集肿瘤干细胞亚群的唯一方法就是明确它们的功能特点。肿瘤干细胞的富集是通过表达不同的标记蛋白，如 CD44、CD38，或者 CD34（Lobo et al.，2007；Greve et al.，2012），或者通过细胞内酶活性、反应性氧产物浓度、线粒体膜抗细胞毒性产物的潜能或缺氧，细胞黏附、迁移、增殖及其他物理特性。所有这些方法已经有很好的综述（Duan et al.，2013）。肿瘤干细胞的富集最终是通过异种移植试验验证，不同肿瘤类型和标记分子的结果差异非常大。例如，超过 25%的黑色素瘤细胞没有明显的生化表型，具有成瘤性（Quintana et al.，2008），而多个报道指出特定的肿瘤细胞中小于 5%的细胞具有成瘤性（Lobo et al.，2007）。已经越来越清楚，宿主的基因型和肿瘤干细胞成瘤的时间跨度也会影响这些肿瘤干细胞活性的分析结果（Labarge，2010）。

*由 Tiina Jokela，University of Bergen，Norway and Mark A LaBarge，Lawrence Berkeley National Laboratory，CA，USA 提供。

肿瘤干细胞的培养 最后，尚需要建立确切的能保持肿瘤干细胞的培养方法。正常干细胞活性是在特异的龛位中维持的（Scadden，2006），我们假定肿瘤干细胞也同样依赖于它们的龛位（Labarge，2010）。传统塑料皿的单层培养条件可能不能模拟体内肿瘤干细胞的龛位。物理的、化学的、三维的、细胞与细胞、细胞与细胞外基质的相互作用对维持肿瘤干细胞表型所必要的条件都需要阐明和概括（图 26.9，表 26.3）。此外，生长因子和氧浓度的调节信号也能促进干细胞样状态的获得（Heddleston et al.，2010），甚至低血清或无血清培养条件也被报道可支持干细胞表型，不会诱导基因组的不稳定性（Loo et al.，1987）。肿瘤特异的细胞类型，如基质成纤维细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和脂肪细胞，也可能是肿瘤干细胞龛位的重要组分（Hale et al.，2012；Park et al.，2014；Ishikawa et al.，2014；Ghajar et al.，2013；Krishnamurthy et al.，2014）。



图 26.9 干细胞龛位。物理的、化学的、三维的、细胞与细胞、细胞与细胞外基质的相互作用对维持肿瘤干细胞的局部微环境是必需的

表 26.3 肿瘤干细胞龛位

肿瘤干细胞龛位推测的特征	详细内容
物理特征——密度	Liu et al.，2014
氧张力	Heddleston，2010
细胞与细胞接触	Hale et al.，2012
细胞与细胞外基质接触	Labarge et al.，2009
旁分泌、自分泌和内分泌信号分子——细胞因子	Chin and Wang，2014
几何结构——3D	Weigelt et al.，2014

目前为止，体外培养时维持细胞的肿瘤干细胞活性是一个尚未很好解决的难题。然而 3D 培养平台上可以更精确地控制微环境三维、物理和分子特征，这些进步对肿瘤干细胞研究者是一个很好的机遇（Kimlin et al.，2013；Weigelt et al.，2014）。

参 考 文 献

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisúa Belmonte JCI (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**:1276–1284.

Abo-Zena RA, Horwitz ME (2002). Immunomodulation in stem-cell transplantation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**(4):452–457.

Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* **8**(2):375–392.

Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes

S (2004). Hepatic stem cells: From inside and outside the liver? *Cell Prolif.* **37**:1.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**:968–973.

Anjos-Afonso F, Currie E, Palmer HG, Foster KE, Taussig DC, Bonnet D (2013). CD34(-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell* **13**(2):161−174.

Atala A (2012). Human embryonic stem cells: early hints on safety and efficacy. *Lancet* **379**(9817):689−690.

Baum CM, Weissman I.L, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(7):2804−2808.

Beck B, Blanpain C (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**:727–738.

Bentivegna A, Miloso M, Riva G, Foudah D, Butta V, Dalpra L, Tredici G (2013) DNA methylation changes during in vitro propagation of human mesenchymal stem cells: Implications for their genomic stability? *Stem Cells Int.* 192425. doi: 10.1155/2013/192425.

Berardi AC, Meffre E, Pflumio F, Katz A, Vainchenker W, Schiff C, Coulombel L (1997). Individual CD34+CD38lowCD19-. *Blood* **89**(10):3554−3564.

Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* **4**(9):1038−1045.

Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY (2013). The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* **19**(1):35−42.

Bifari F, Pacelli L, Krampera M (2010). Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J. Stem Cells* **2**(3):50−60.

Boheler KR (2009). Stem cell pluripotency: A cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J. Cell. Physiol.* **221**:10−17.

Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, Cooke MP (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* **329**(5997):1345−1348.

Booth C, O'Shea JA, Potten CS (1999). Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **249**:359−366.

Breems DA, Blokland EA, Neben S, Ploemacher RE (1994). Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* **8**(7):1095−1104.

Bunting KD, Ed. (2008). *Hematopoietic stem cell protocols*, 2nd ed., *Methods in molecular biology*, Vol. 430 Totowa, NJ, Humana Press.

Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J (2003). Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat. Cell Biol.* **5**:640–646.

Caplan AI (2005). Review: Mesenchymal stem cells: Cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* **11**(7−8):1198−1211.

Caplan AI (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* **213**(2):341−347.

Caplan AI (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J. Pathol.* **217**(2):318−324.

Chang JY, Wang C, Jin C, Yang C, Huang Y, Liu J, McKeehan WL, D'Souza RN, Wang F (2013a). Self-renewal and multilineage differentiation of mouse dental epithelial stem cells. *Stem Cell Res.* **11**, 990−1002.

Chang JY, Wang C, Liu J, Huang Y, Jin C, Yang C, Hai B, Liu F, D'Souza RN, McKeehan WL, Wang F (2013b). Fibroblast growth factor signaling is essential for self-renewal of dental epithelial stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**:28952−28961.

Chin AR, Wang SE (2014) Cytokines driving breast cancer stemness. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**:598−602.

Chung S, Shin BS, Hwang M, Lardaro T, Kang UJ, Isacson O, Kim KS (2006). Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* **24**:1583−1593.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**(1):157−165.

Colman A, Dreesen O (2009). Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* **5**(3):244−247.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring H-J, Mattheus U, Mack A, Wagner H-J, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert K-D, Stenzl A, Skutella T (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* **456**:344−349.

Cooke JA, Minger SL (2007). Human embryonal stem cell lines: Derivation and culture. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 22−59.

Demirbag B, Huri PY, Kose GT, Buyuksungur A, Hasirci V (2011). Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnol. J.* **6**(12):1437−1453.

Deng J, Steindler DA, Laywell ED, Petersen BE (2003). Neural transdifferentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain. *Exp. Neurol.* **182**:373–382.

Dexter TJ, Spooncer E, Simmons P, Allen TD (1984). Long-term marrow culture: An overview of technique and experience. In WrightDG, GreenbergerJS (eds.), *Long-term bone marrow culture*. New York: Alan R. Liss, Kroc Foundation Series **Vol.18**, pp. 57–96.

Dick JE (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat. Biotechnol.* **27**:44−46.

Ditadi A, de Coppi P, Picone O, Gautreau L, Smati R, Six E, Bonhomme D, Ezine S, Frydman R, Cavazzana-Calvo M, André-Schmutz I (2009). Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. *Blood* **113**:3953−3960.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17**:1253−1270.

Douglas GC, Vandevoort C, Kumar P, Chang TC, Golos TG (2009). Trophoblast stem cells: Models for investigating trophectoderm differentiation and placental development. *Endocr. Rev.* **30**:228−240.

Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J Anat.* **200**:249–258.

Duan JJ, Qiu W, Xu SL, Wang B, Ye XZ, Ping YF, Zhang X, Bian XW, Yu SC (2013). Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. *Stem Cells Dev.* **22**:2221−2239.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819):154−156.

Evans-Molina C, Vestermark GL, Mirmira RG (2009). Development of insulin-producing cells from primitive biologic precursors. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **14**:56−63.

Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R (2012). Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **29**(1):1−63.

Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* **427**:148−154.

Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, Almeida D, Koller A, Hajjar KA, Stainier DY, Chen EI, Lyden D,

Bissell MJ (2013) The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat. Cell Biol.* **15**:807−817.

Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G (2008). The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J. Cell. Biochem.* **103**:408−412 (2008).

Greco B, Recht L (2003). Somatic plasticity of neural stem cells: Fact or fancy? *J. Cell. Biochem.* **88**:51−56.

Gregory CA, Prockop DJ (2007). Fundamentals of culture and characterization of mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) from bone marrow stroma. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 208−232.

Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Gotte M (2012) Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A* **81**:284−293.

Grompe M (2012). Tissue stem cells: New tools and functional diversity. *Cell Stem Cell* **10**(6):685−689.

Gruh I, Martin U (2009). Transdifferentiation of stem cells: A critical view. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **114**:73−106.

Gunji Y, Nakamura M, Osawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Miura Y, Yanagisawa M, Suda T (1993). Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KITlow cells than in KIThigh cells. *Blood* **82**(11):3283−3289.

Hale JS, Li M, Lathia JD (2012) The malignant social network: Cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. *Cell Adhes. Migr.* **6**:346−355.

Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**:461–463.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**(5858):1920−1923.

Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM (1996). Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* **88** (9):3306−3313.

Harrison DE, Stone M, Astle CM (1990). Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *J. Exp. Med.* **172** (2):431−437.

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN (2010) Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **102**:789−795.

Heyworth CM, Spooncer E (1992). *In vitro* clonal assays for murine multipotential and lineage restricted myeloid progenitor cells. In TestaNG, MolineuxG (eds.), *Haemopoiesis: A practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 37–54

HFEA (www.hfea.gov.uk).

Hill B, Rozler E, Travis M, Chen S, Zannetino A, Simmons P, Galy A, Chen B, Hoffman R (1996). High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp.Hematol.* **24**(8):936−943.

Hofmann S, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Meinel L (2006). Tisue engineering of bone. In Vunjak-Novokovic G, Freshney RI (eds.), *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 325−373.

Hogge DE, Lansdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ (1996). Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **88**(10):3765−3773.

Hole N (1999). Embryonic stem cell-derived haematopoiesis. *Cells Tissues Organs* **165**(3−4):181−189.

Holmes R, Zuniga-Pflucker JC (2009). The OP9-DL1 system: Generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro. *Cold Spring Harb.Protoc.* (PM:20147086).

Howe M, Zhao J, Bodenburg Y, McGuckin CP, Forraz N, Tilton RG, Urban RJ, Denner L (2009). Oct-4A isoform is expressed in human cord blood-derived CD133 stem cells and differentiated progeny. *Cell Prolif.* **42**:265−275.

Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, Denk H (2006). Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**:2203−2210.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S-B, Muhlestein W, Melton DA (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**:1269−1275.

Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J.* **32**(20):2708−2721.

Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL (2008). CD44+CD24- prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br. J. Cancer* **98**:756−765.

Huynh H, Iizuka S, Kaba M, Kirak O, Zheng J, Lodish HF, Zhang CC (2008). Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **26**(6):1628−1635.

Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, Takamatsu K, Kunihiro S, Ishii H, Nishikata T (2014). Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells. *Cancers (Basel)* **6**:1570−1578.

Judson R, Blelloch R (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* **27**:459−461.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**:715−716.

Kang TW, Choi SW, Yang SR, Shin TH, Kim HS, Yu KR, Hong IS, Ro S, Cho JM, Kang KS (2014). Growth arrest and forced differentiation of human primary glioblastoma multiforme by a novel small molecule. *Sci. Rep.* **4**:5546.

Kasper S (2008). Stem cells: The root of prostate cancer? *J. Cell. Physiol.* **216**:332−336.

Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* **104**:3581–3587.

Keenen B, de la Serna I.L (2008). Chromatin remodeling in embryonic stem cells: Regulating the balance between pluripotency and differentiation. *J. Cell. Physiol.* **219**:1−7.

Kerr DA, Llado J, Shamblott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, Krishnan C, Dike S, Gearhart JD, Rothstein JD (2003). Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J. Neurosci.* **23**:5131–5140.

Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM (2013) In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol. Carcinogen.* **52**:167−182.

Kondo T, Raff M (2004). Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev.* **18**:2963−2972.

Krishnamurthy S, Warner KA, Dong Z, Imai A, Nor C, Ward BB, Helman JI, Taichman RS, Bellile EL, McCauley LK, Polverini PJ, Prince ME, Wicha MS, Nor JE (2014). Endothelial interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells. *Stem Cells* **32**(11):2845−2857.

Labarge MA (2010) The difficulty of targeting cancer stem cell

niches. *Clin. Cancer Res.* **16**:3121–3129.

Labarge MA, Garbe JC, Stampfer MR (2013). Processing of human reduction mammoplasty and mastectomy tissues for cell culture. *J. Visual Exp.* **2013**(71):50011.

Labarge MA, Nelson CM, Villadsen R, Fridriksdottir A, Ruth JR, Stampfer MR, Petersen OW, Bissell MJ (2009). Human mammary progenitor cell fate decisions are products of interactions with combinatorial microenvironments. *Integr. Biol. (Cambridge)* **1**:70–79.

Labarge MA, Petersen OW, Bissell MJ (2007). Culturing mammary stem cells. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 282–302.

Ladd AC, Pyatt R, Gothot A, Rice S, McMahel J, Traycoff CM, Srour EF (1997). Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood* **90**(2):658–668.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* **260**(5110):920–926.

Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ (1990). Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *J. Exp. Med.* **172**(1):363–366.

Larson BL, Ylostalo J, Lee RH, Gregory C, Prockop DJ (2010). Sox11 is expressed in early progenitor human multipotent stromal cells and decreases with extensive expansion of the cells. *Tissue Eng. Part A* **16**(11):3385–3394.

Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF (2003). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**:295–301.

Lefort N, Feyeux M, Bas C, Féraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, Peschanski M, Perrier AL (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* **26**:1364–1366.

Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat. Methods* **6**:805–808.

Liu C, Liu Y, Xu XX, Wu H, Xie HG, Chen L, Lu T, Yang L, Guo X, Sun GW, Wang W, Ma XJ, He X (2014) Potential effect of matrix stiffness on the enrichment of tumor initiating cells under three-dimensional culture conditions. *Exp. Cell Res.*

Liu M, Miller CL, Eaves CJ (2013) Human long-term culture initiating cell assay. In HelgasonCL, MillerC (eds.), *Basic cell culture protocols. Vol. 946D, Methods in molecular biology*. pp. 241-256.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **23**:675–699.

Lokesh Battula V, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring H-J (2007). Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* **75**:279–291.

Loo DT, Fuquay JI, Rawson CL, Barnes DW (1987). Extended culture of mouse embryo cells without senescence: Inhibition by serum. *Science* **236**:200–202.

Ma T, Grayson WL, Fröhlich M, Vunjak-Novakovic G (2009). Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Progress* **25**:32–42..

Martin GR (1975). Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* **5**:229–243.

Martin GR (1978). Advantages and limitations of teratocarcinoma stem cells as models of development. In JohnsonMH (ed.), *Development in mammals*, Vol. **3**. Amsterdam: North-Holland Publishing, p. 225.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(12):7634–7638.

Martin GR, Evans MJ (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* **2**:163–172.

Mason C, Lanza R, Menasché P, Naughton G, Stacey G (2012). Cell therapy and regenerative medicine glossary. *Regen. Med.* **7**(Suppl. 3):S14–S116.

McGuckin CP, Forraz N, Allouard Q, Pettengell R (2004). Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp. Cell Res.* **295**:350–359.

Monaghan JR, Maden M (2012). Cellular plasticity during vertebrate appendage regeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **367**:53–74.

Monti M, Perotti C, Del Fante C, Cervio M, Redi CA, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo PvI (2012). Stem cells: Sources and therapies. *Biol. Res.* **45**(3):207–214.

Murray LJ, Bruno E, Uchida N, Hoffman R, Nayar R, Yeo EL, Schuh AC, Sutherland DR (1999). CD109 is expressed on a subpopulation of CD34+ cells enriched in hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp. Hematol.* **27**(8):1282–1294.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**:101–106.

Newman MB, Davis CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR (2003). Human umbilical cord blood (HUCB) cells for central nervous system repair. *Neurotox. Res.* **5**:355–368.

NIBIB (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering). Available from:

NIH (http://report.nih.gov/nihfactsheets/Pdfs/RegenerativeMedicine%28NIBIB%29.pdf).

NIH (2006). *Regenerative medicine* (http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf).

NIH *Stem cells* (http://stemcells.nih.gov).

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**(6039):218–221.

Nowak JA, Fuchs E (2009). Isolation and culture of epithelial stem cells. *Methods Mol. Biol.* **482**:215–232.

Paquet-Durand F, Tan S, Bicker G (2004). Turning teratocarcinoma cells into neurons: Rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **142**:161–167.

Park TS, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Zambidis ET, Zimmerlin L (2014) Dynamic interactions between cancer stem cells and their stromal partners. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2**:41–52.

Perin L, Giuliani S, Jin D, Sedrakyan S, Carraro G, Habibian R, Warburton D, Atala A, De Filippo RE (2007). Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Prolif.* **40**:936–948.

Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* **75**(3):424–436.

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P (2009). Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* **4**:568–580.

Pontier SM, Muller WJ (2009). Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression–a role in cancer stem cells? *J. Cell Sci.* **122**:207–214.

Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H.(2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* **71**:28–41.

Prockop DJ (2009). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells.

(MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.* **17**(6):939–946.

Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL (2010). Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells. (MSCs). *J. Cell Mol. Med.* **14**(9):2190–2199.

Prockop DJ, Oh JY (2012). Medical therapies with adult stem/progenitor cells. (MSCs): A backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *J. Cell. Biochem.* **113**(5):1460–1469.

Punzel M, Wissink SD, Miller JS, Moore KA, Lemischka IR, Verfaillie CM (1999). The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood* **93**(11):3750–3756.

Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**:593–598.

Raveh-Amit H, Berzsenyi S, Vas V, Ye D, Dinnyes A (2013). Tissue resident stem cells: Till death do us part. *Biogerontology* **14**:573–590.

Reynolds BA, Rietze RL (2005) Neural stem cells and neurospheres–re-evaluating the relationship. *Nat. Methods* **2**:333–336.

Rezza A, Sennett R, Rendl M (2014). Adult stem cell niches: Cellular and molecular components. *Curr. Top. Dev. Biol.* **107**:333–372.

Rieske P, Augelli BJ, Stawski R, Gaughan J, Azizi SA, Krynska B (2009). A population of human brain cells expressing phenotypic markers of more than one lineage can be induced in vitro to differentiate into mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* **315**:462–473.

Rippon HJ, Bishop AE (2004). Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37**:23–34.

Rizzino A (2002). Embryonic stem cells provide a powerful and versatile model system. *Vitam. Horm.* **64**:1–42.

Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE (2009). ABCG2: A perspective. *Drug Deliv. Rev.* **61**:3–13.

Roper S, Hemberger M (2009). Defining pathways that enforce cell lineage specification in early development and stem cells. *Cell Cycle* **8**:1515–1525.

Roy S, Gascard P, Dumont N, Zhao J, Pan D, Petrie S, Margeta M, Tlsty TD (2013). Rare somatic cells from human breast tissue exhibit extensive lineage plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(12):4598–4603.

Sanchez-Ramos JR (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosci. Res.* **69**:880–893.

Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK (2004). In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* **23**(43):7223–7232.

Scadden DT (2014). Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* **157**:41–50.

Scadden DT (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**:1075–1079.

Schamblott MJ, Axelman J, Sterneckert J, Christoforou N, Patterson ES, Siddiqi MA, Kahler H, Ifeanyi LA, Gearhart JD (2002). Stem cell culture: Pluripotent stem cells. In Atala A, Lanza RP (eds.), *Methods of tissue engineering*. San Diego: Academic Press, pp. 411–420.

Schamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13726–13731.

Schofield R (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**:7–25.

Simon A, Tanaka EM (2013). Limb regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**(2):291–300.

Sirinoglu DI, Tekgunduz E, Altuntas F (2012). What is the most appropriate source for hematopoietic stem cell translantation? Peripheral stem cell/bone marrow/cord blood. *Bone Marrow Res.* (PM:23056949).

Smith A (2006). A glossary for stem cell biology. *Nature* **441**:1060.

Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* **28**:64–74.

Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S (2007). Multipotent stem cells in dental pulp. In Freshney RI, Stacey GN, Aurebach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 187–206.

Spooncer E, Eliason J, Dexter TM (1992). Long-term mouse bone marrow cultures. In TestaNG, MolineuxG (eds.), *Haemopoiesis: A practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford Univ. Press, pp. 55–74.

Srour EF, Zanjani ED, Brandt JE, Leemhuis T, Briddell RA, Heerema NA, Hoffman R (1992). Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells. *Blood* **79**(6):1404–1412.

Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**:945–949.

Stoltz JF, Bensoussan D, Decot V, Ciree A, Netter P, Gillet P (2006). Cell and tissue engineering and clinical applications: An overview. *Biomed. Mater. Eng.* **16**(Suppl. 4):S3–S18.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* **74** (5):1563–1570.

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(9):3584–3588.

Suva D, Garavaglia G, Menetrey J, Chapuis B, Hoffmeyer P, Bernheim L, Kindler V (2004). Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **198**:110–118.

Takahashi K (2014). Cellular reprogramming. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**(2). (PMID: 24492711).

Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**:663–676.

Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+. *Blood* **77**(6): 1218–1227.

Tesei A, Zoli W, Arienti C, Storci G, Granato AM, Pasquinelli G, Valente S, Orrico C, Rosetti M, Vannini I, Dubini A, Dell'Amore D, Amadori D, Bonafè M (2009). Isolation of stem/progenitor cells from normal lung tissue of adult humans. *Cell Prolif.* **42**:298–308.

Theise ND (2005). On experimental design and discourse in plasticity research. *Stem Cell Rev.* **1**(1):9–13 (review).

Theise ND, Krause DS (2002). Toward a new paradigm of cell plasticity. *Leukemia* **16**(4):542–548 (review).

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391):1145–1147.

Till JE, McCulloch EA (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**:213–222.

Turnpenny L, Hanley N (2007). Culture of the human germ cell lineage. In Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM (eds.), *Culture of human stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley, pp. 107–132.

Uchida N, Yang Z, Combs J, Pourquie O, Nguyen M, Ramanathan R, Fu J, Welply A, Chen S, Weddell G, Sharma AK, Leiby KR, Karagogeos D, Hill B, Humeau L, Stallcup WB, Hoffman R, Tsukamoto AS, Gearing DP, Peault B (1997). The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* **89**(8):2706–2716.

Udomsakdi C, Eaves CJ, Sutherland HJ, Lansdorp PM (1991). Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using rhodamine-123. *Exp.Hematol.* **19**(5):338–342.

Vacanti JP, Langer R (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354**(Suppl. 1):SI32–S134.

Van Staveren WC, Solis DY, Hebrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C (2009). Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim. Biophys. Acta* **1795**:92–103.

Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP (2008). Cancer stem cells–old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* **15**:947–958.

Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R (2002). Neural stem cells: Plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs* **171**:64–76.

Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M (2011). Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(24):9875–9880.

Walasek MA, van Os R, de Haan G (2012). Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann. NY Acad. Sci.* **1266**:138–150.

Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **69–70**:42–51.

Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM (2003). Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells. *Cell Prolif.* **36**(s1):17–32.

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaj K, Sung H-K, Nagy A (2009). PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**:766–770.

Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'amour KA, Lie CC, Gage FH (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* **430**:350–356.

Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON (2007) Self-renewal and multilineage differentiation in vitro from murine prostate stem cells. *Stem Cells* **25**: 2760–2769.

Yeung J, Wai Eric So AC (2009). Identification and characterization of hematopoietic stem and progenitor cell populations in mouse bone marrow by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **538**:1–15.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**(12):5002–5012.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**(5928):797–801.

Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, Lodish HF (2006). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **12**(2):240–245.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro A-M, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7**:1028–1034.

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* **71**:18–27.

（韩　钦　译）

第27章

培训纲要

27.1 目　　的

本书的设计初衷是提供组织培养操作程序的信息来源，同时提供某些实际操作方案中的背景资料和操作过程中的原理解释。此外，也有必要为那些培训他人的人们提供一本组织培养技术的教程。一个独立的工作者可以根据他的需要来阅读本书的某些部分；但对于实践经验有限的学生或正在接受培训的技术员，则可根据以往的经验和导师的需求向他们推荐培训纲要。本章旨在为指导教师提供基本的、新颖的、特殊水平的培训纲要，以及在培养新手时如何使用与变更这些内容。表27.1中粗体字所标的练习项目是必须掌握的内容。

表27.1　培训纲要

练习	过程（其中粗体标示是主要的）	培训目的	基本方案
		基本的准备和操作技能	
1.	**液体的吸取和转移**	熟练。注意操作技能和准确性	5.1，5.2
2.	玻璃器皿的清洗和灭菌	熟练支持服务。了解玻璃容器清洗和无毒性的必要性	10.1
3.	水的制备和灭菌	正确认识水的纯化和灭菌的必要性；应用和限制；用高压锅灭菌	10.5
4.	不含酚红的D-PBS的制备	盐溶液的组成；渗透压；缓冲液和pH控制；用高压灭菌锅灭菌热稳定溶液	10.6
5.	制备pH标准色阶，含酚红的D-PBS	熟悉酚红作为pH指示剂的使用	8.1
6.	储备培养基制备和使用过滤器灭菌	过滤技术及其选择范围的正确判断	10.9，10.10~10.13
		基本细胞培养技术	
7.	**培养细胞的观察**	使用倒置显微镜，正确区分不同细胞系的细胞形态，照相机的使用和准备好参考照片	18.1，18.5
8.	**无菌技术：准备培养基用于实验**	无菌操作。无污染情况下熟练操作灭菌试剂和培养瓶。向培养基中加入其他补充物	5.1，10.7
9.	**培养物的饲养**	判断培养物是否需要更换培养基	12.1
10.	**用10×储存液配制完全培养基**	无菌操作；培养基的组成；pH控制	10.8

续表

练习	过程（其中粗体标示是主要的）	培训目的	基本方案
11.	**用血细胞计数板或电子计数器计数细胞**	定量计数技术。细胞计数和细胞活力的判断。两种方法相对优点的评价	23.1，23.2
12.	**悬浮连续细胞系的传代**	评价培养物；无菌操作；细胞计数和活力判断，选择再接种浓度	12.4
13.	**单层贴壁连续细胞系的传代**	评价培养物；无菌操作；如何分散细胞；胰蛋白酶消化技术	12.3
14.	单层细胞的 Giemsa 染色	细胞学；相差显微镜术；固定和染色；摄影	18.1，18.2，18.5
15.	制作和分析生长曲线	多孔培养板中的复制传代；细胞计数；选择再接种浓度	23.8，23.1，23.2
		高阶培养技术	
16.	**细胞系特征**	细胞系的确证，增加对过度生长、错误鉴定、交叉感染的了解	13.4 或 13.1 或 13,3
17.	**支原体的检测**	了解支原体筛查的重要性；积累常规细胞系检查中用荧光或 PCR 方法检测有无支原体污染的经验	14.1 或 14.2
18.	**冷冻保存**	如何冷冻保存细胞、准备细胞系和冻存信息记录、储存控制	15.1，15.2
19.	**原代培养**	培养细胞的起源和多样性；各种原代培养的方法学	11.2，11.6 或 11.7
20.	单层细胞的克隆培养	稀释克隆培养技术；测定贴壁效率；分离克隆	16.1，23.10，16.6
		特殊细胞培养技术	
21.	悬浮克隆	稀释悬浮克隆技术，悬浮克隆的分离	16.4 或 16.5；16.7
22.	选择性培养基	特殊细胞类型的选择性生长的证实	25.1-Su 或 25.2-Su
23.	细胞分离	从几种分离方法中选择一种方法分离所需表型的细胞类型	17.1 或 17.2
24.	饲养层细胞的制备	如何提高克隆形成率；饲养层细胞的选择性作用	16.3
25.	滤膜小皿组件中的组织型培养	熟悉高密度培养；分化潜力、营养转运、侵袭实验	20.3
26.	细胞毒性分析	熟悉高通量筛查方法；阳性和阴性作用	24.4
27.	生存力分析（可以作为练习 20 的一部分或单独的一个练习）	用克隆形成实验来鉴定细胞存活或增殖的阳性或阴性作用	24.3

教程由一系列标准格式的练习组成，包括相互参照的标准操作程序、背景知识和辅助程序。辅助程序没有列在练习项目中，但它与其他总体相关。相互参照列在每项练习的背景知识部分，在资料及操作中不再重复，这是因为考虑到学生或技术员在进行练习之前或进行练习过程中没有基本信息来源时，他们势必会阅读相关的背景资料。在实践中要按说明重复操作程序，同时，也建议作一些可能的修改，使每一个练习更加有趣，以及生成一些数据可供操作者分析。大部分练习使用最小的样本数以减少操作时间和复杂性，因此，操作者要注意在标准实践情形下需要更多的重复。这些练习依据操作难度从最基本的到复杂的顺序排列，表 27.1 对这些练习做了总结，其中必不可少的练习用粗体字表示，这些基础和高阶练习不但应用范围较广，而且具有良好的通用背景。当然，人们可以根据有效时间和具体的实验条件作出一定程度的选择。

如果需要一个以上的操作方案，以分号分开；如果有可选的操作方案，编号将用“或”来分开，指导教师可以决定选择那些更相关或最适合的实验室工作方案。推荐采用表 27.1 中所有的基本和高级练习，其中粗体标示的是主要的，指导者可以在特定部分进行更多的选择。

每个练习中列出了辅助的或相关的步骤。这些不是练习的一部分，但是如果实验室或学生/实习生对其特别感兴趣的话也可以灵活采纳。

27.2 实验制备及操作技巧

这部分练习是实习生或学生首先应该接触的内容，能够帮助实习生学习必要的无菌操作并懂得如何准备灭菌试剂和材料。大多数练习是简单并能直接完成的，目的是增强操作技巧及为后期练习做准备。有些练习枯燥乏味并远离实际的细胞培养，因此导师可以选择与 27.3 节基本的细胞培养技术同时进行。

参观组织培养设施是一个必要的入门步骤，这可以使实习生与其他工作人员接触，明确他们的角色和责任，了解需要达到的准备水平。要清楚储存的原则，需要注意灭菌和未灭菌物品的摆放与包装，组织培养级和非组织培养级塑料制品、使用物品和备份的储存，放在室温和放在 4℃或–20℃的液体的区别；实习生需要知道储存物品的更换，不同物品的保存期限，如何获得更替物品，备份物品如果快过期了要通知谁，调换物品顺序，以便先使用早灭菌的物品。应让实习生知道可根据购买库存商品上标注的条形码追踪购买库存物品的来源。同时使得供应商跟踪项目的整个过程，以及是否符合 GMP 和 GLP 的要求。实习生应根据他们的实验目的参加准备过程。

练习 1 液体无菌吸取和转移

目的

快速、准确、无菌地将液体从一个容器转移到另一个容器。

应用

培养基的制备、培养物的换液加液、细胞传代及所有与液体相关的人工操作。

训练目标

熟练掌握吸管的使用；掌握必要的快速、准确、重复的无菌操作技术。例如，虽然在常规工作中快速、重复比准确性更重要，但做实验时准确性应居首位。

监督：开始时连续监督，稍后让实习生重复练习，并记录准确度。

时间：30min~1h。

背景信息

已灭菌液体的操作（参见 4.2.3 节）；试剂瓶和培养瓶的操作（参见 5.3.4 节）；移液（参见 5.3.5 节）。

标准方案：灭菌技术（参见方案 5.1 或方案 5.2）。

示范材料或操作：教师需示范吸管的使用，将吸管插入移液器，转移液体，并对速度和准确性间的协调给出指导建议。教师也需要示范用真空泵抽出液体（如果实验室采用）并解释其机制和安全性规定。

练习1说明

参照方案5.1，如果没有BSC，参照方案5.2进行。

概要

清洁并擦拭工作区，准备好试剂瓶、培养瓶、移液管等。将培养基从试剂瓶转移到培养瓶。最后整理台面，用70%乙醇擦拭工作台。

材料

无菌（放入BSC中）

- 含有Hanks盐和碳酸氢钠的Eagle's 1×MEM，不含抗生素，100mL
- 塞有棉花的刻度移液管，1mL、5mL、10mL、25ml；玻璃或大包装的塑料移液管放在灭菌的四方灭菌筒中，或单独包装的塑料移液管
- 培养瓶，$25cm^2$，标记，盖上盖，预称重量，10个
- Petri培养皿，5cm，标记，盖上盖，预称重量，10个

非无菌

- 移液管控制器或洗耳球，置BSC内
- 70%乙醇装入喷雾瓶中，置BSC内
- 不含棉绒的棉球或擦拭纸，置BSC旁
- 吸水纸，置BSC旁
- 盛有水和消毒剂的吸管收集筒，置于BSC旁边的地板上
- 废物箱（装废弃的纸、棉签和包装纸），放置在BSC旁边的地板上，吸管收集筒的另一侧
- 抽吸器吸管或带盖的废弃物烧杯（抽吸器/装有消毒剂的废液烧杯），置BSC内
- 剪刀
- 乙醇不溶性的墨水记号笔
- 笔记本，笔，实验方案

操作步骤

1. 用酒精棉球或消毒纸巾擦拭BSC面和所有BSC上摆放的物品表面，包括前面的玻璃屏风。

2. 从冷冻箱、水浴槽中取出培养基及所用试剂或其他从冰箱中取出待溶解的物品，用乙醇擦拭试剂瓶，将首先要用的物品摆放在BSC内。

3. 将移液管摆放在超净台后侧面而又易于拿到的地方。

4. 打开移液管筒，将筒盖放在开口端的上方或旁边，按规格摆放移液管筒，或打开独立包装的移液管，按规格将移液管放在架子上。

5. 整理好其他玻璃器皿、塑料制品、仪器及需要的物品，将它们放于推车中或附近的工作台上。

6. 拧松但不要移去所有将要使用的培养瓶瓶盖。

7. 打开将要用移液管移入溶液的试剂瓶瓶盖，以及要从中吸取溶液的瓶子的盖子。将打开的瓶盖开口朝上，放在BSC的后部或瓶子的后面，以保证你的手在操作时不会越过它们的上方。

8. 选择移液管

(a) 如果选玻璃制品：

(i) 从筒中取出一个移液管，笔直地取出，尽量少碰及筒中的其他移液管，特别是移液管的尖头（如果

将要取出的移液管碰到筒中其他移液管的底部，那么丢弃它）。

（ii）在移液管末端安放一个移液控制器或洗耳球，管口不要朝向你自己。手握时一定要在刻度上端，这样可保证移液管进入瓶子或试剂瓶不会被污染。

（b）如果是独立包装的塑料移液管：

（i）从顶部打开包装。

（ii）剥开包装纸，使外皮卷向内面。

（iii）将移液管末端安上洗耳球或移液控制器。

（iv）从包装中取出移液管，保证不接触到包裹外面其他部位或移液管碰到其他未灭菌物的表面。

（v）将包装纸丢进垃圾箱。

▲安全提示 *将移液管插入洗耳球中或移液控制器时不要过分使劲，力量太大会导致移液管破裂。*

9. 当插上洗耳球或移液控制器的移液管时，它们与你手臂保持垂直的角度，保证移液管的头部不要碰到培养瓶外侧或BSC内侧面；时刻注意移液管的位置。当你学习无菌操作技术时，这个过程并不容易，但它是成功实验的一个重要因素，多加练习则熟能生巧。

10. 将含有培养基的培养瓶斜向你手中拿的移液管，这样你的手便不会越过打开的瓶口，用5mL移液管吸取5mL培养液并将其转移到一个T-25试剂瓶中。

11. 重复上述操作4次。当你用移液管转移液体到好几个培养瓶或试剂瓶中时，瓶子可以摞起平放，但要确保试剂瓶放在BSC后部，这样你的手不会越过瓶颈口。记录加入培养基到5个试剂瓶中所用的时间。

12. 将用过的移液管放入装有消毒剂的移液管收集筒中消毒，将塑料移液管放入双层厚度的高压生物灭菌袋中。

13. 将试剂瓶重新盖上盖子。

14. 重复上述过程，用一个25mL的移液管转移5mL培养液分别加入到5个试剂瓶中。记录移液至5个瓶中所需时间。

15. 盖上培养瓶和试剂瓶，当你完成了一个特定的训练项目时，瓶子可以暂时不盖，但不论任何原因你离开BSC时，瓶子一定要盖上。

注意事项 *在垂直式层流超净台工作时，不要在立即打开的试剂瓶的上方操作；在水平式层流超净台工作时，不要在打开瓶口的后面操作。*

16. 操作完成后，拧紧所有瓶盖，将不再需要的溶液和实验材料从超净台移走，擦净工作台面。

17. 称量试剂瓶重，以便准确知道每瓶培养液重量。

18. 放入37℃培养一周，检查可能的污染状况。

用5cm或6cm的Petri培养皿重复实验

1. 将培养皿放在超净台的一侧。

2. 放置含培养基的培养瓶并将瓶盖拧松。

3. 将培养皿放入超净台中央。

4. 打开培养瓶瓶盖，用移液管从瓶中取出5mL。

5. 移走培养皿的盖子放到培养皿后。

6. 向培养皿中加入培养液，直接让培养液沿着培养皿的一侧流到培养皿底部。

7. 盖上盖子。

8. 丢弃移液管。

9. 将培养皿放到一侧，注意不要让培养液流进盖子和培养皿边缘的缝隙中。

10. 重复上述操作，将培养液加入其余4个培养皿中。

11. 再用5个培养皿和25mL移液管重复操作。
12. 丢弃移液管。
13. 称重培养皿。
14. 将培养皿放入CO_2培养箱培养一周，检查可能的污染。

数据

（1）计算每个培养瓶中液体的平均质量。
（2）记录其范围并以分装液体体积所占的百分比计算误差。

分析

（1）比较每个吸管的结果并评论其差别。
（a）准确性
（b）时间
（2）如何正确选择吸管？
（3）在移液的精度范围内可接受的误差是多少？
（4）绝对的准确性或一致性哪个更重要？

练习2　玻璃器皿的清洗和灭菌

目的

清洗和重新灭菌污染的玻璃器皿。这项练习虽然不属于实验部分，但也属常规方案。

训练目标

了解正确的准备工作和无菌区外的质量控制。
监督：推荐有经验的清洁工带实习生熟悉标准程序。
时间：每次20~30min较合适，所花的时间取决于实习生所参与的程度和指导教师的指导技能。

背景信息

准备区（参见3.2.6节）；清洗（参见4.4.1节）；玻璃器皿清洗机（图4.21）；灭菌器（参见4.4.3节，图4.23）；清洗和灭菌设备（参见10.3节）。**标准方案：**设备准备（参见方案10.1～方案10.3）。**补充方案：**过滤装置的灭菌（参见方案10.4）

示范材料或操作：实习生应当观察每一项准备步骤，只要有可能还应参与，这就要求实习生在短时间内反复观看所有的操作步骤。此外，还应观察所有操作过程中的仪器设备，包括存放、质量控制（QC）、安全措施，虽然受训者不一定会操纵这些设备（除非日后他们有洗刷和消毒这些任务）。

▲安全提示　去污剂中化学药物的危害；高压灭菌锅和烤箱的高温；应按照实验室标准操作（参见6.5.4节和6.5.7节）

练习2说明

概要

玻璃器皿与吸管的收集、漂洗、浸泡、清洗和灭菌。

设备和材料

准备区的常规应用设备（参见方案 10.1~方案 10.3）。

操作步骤

由于这些工作不直接涉及实验本身，可按照下列标准方案操作。

1. 玻璃器皿的准备和灭菌（参见方案 10.1）。
2. 吸管的准备和灭菌（参见方案 10.2）。
3. 螺口盖的准备和灭菌（参见方案 10.3）。

数据

实习生要熟悉注意事项与记录质量控制数据，例如，烤箱和高压灭菌锅所显示的数字及图形信号。

练习 3　水的制备与除菌

目的

纯水、灭菌水的常规供应。

训练目标

在无菌区外正确地进行准备操作。了解水的纯化和制备过程的必要知识。
监督：间断的。
时间：30min。

背景信息

超纯水（UPW；见 10.4.1 节，图 4.22 和图 10.9）。**标准方案**：超纯水的制备及灭菌（参见方案 10.5）。**补充方案**：玻璃器皿的准备（参见方案 10.1）。

示范材料和操作：监督人员要讲解水纯化设备的原理和操作，并示范操作收集、装瓶、灭菌及质量控制的过程。实习生参与监督人和教师对水质的评判。

练习 3 说明

设备和材料

非无菌

- 有刻度的硼硅玻璃器皿（耐热玻璃）或高压塑料（聚碳酸酯）螺旋盖瓶（确保加完水后还有充足的顶部空间），500mL，21 个
- 合适的螺旋瓶盖，21 个
- 灭菌指示条，2 条
- 灭菌指示粘胶带
- 记号笔或记号标签
- 纯化水设备
- 高压灭菌器

- 登记本（准备和灭菌的记录）；笔记本或数据库

操作步骤

1. 将数据记录在笔记上或数据库中；将日期、内容、批数标记于培养瓶（连接在标签打印机上的计算机将自动生成标签）。

2. 隔夜循环后每天早上从净水器中放出 50mL 水，倒掉，用仪器分别检查水的电导率（或电阻率）和总有机碳（TOC），记录到记录本上和你的笔记中。

3. 如果水的标准在特定范围内（25℃时电阻率≥10MΩ，TOC≤10ppb），收集超纯水装入标记好的瓶中。

4. 准备装有去离子水和自来水的标记瓶，将电阻率和 TOC 记录在笔记本中。

5. 使用特殊标记标出容量，例如，430~450mL 水，可稀释 10×浓缩培养基。如果在开放高压条件下灭菌，则增加 10%。

6. 将灭菌指示器放入一个瓶子中（高压灭菌后检查丢弃，所以此瓶只要装自来水）。

7. 用螺旋盖密封瓶子（如果使用的是钠玻璃,则瓶子易于破损，让瓶盖处于松弛状态，按照步骤 4 增加 10%的水）。

8. 将装有无菌指示器的瓶子放在中间。

9. 关上高压灭菌器，检查设置：121℃，100kPa（15lb/in^2，1bar），20min，不选择后真空。

10. 开始灭菌循环。

11. 完成循环之后，核对打印记录，确认条件和时间正确，记录到记录本，同时拷贝一份副本到自己的笔记本上。

12. 保证消毒物品冷却到 50℃以下。

13. 打开高压灭菌器取出灭菌瓶。如果在高压灭菌过程中瓶盖松动，当瓶子温度达到室温时拧紧瓶盖。

14. 用去离子水（或反向渗透水）和自来水重复练习，按照步骤 3 记录电阻和 TOC，但是如果外部条件受限不属于不合格，做上记号保留下来用于练习 10。

注意事项 如果在消毒过程中瓶盖被打开了，若你在瓶子仍然是烫的时候将盖子拧上可能会使某些瓶盖内的衬垫在瓶子冷却时掉入瓶内。此外，也可引起瓶内内容物收缩。同样，第一次打开瓶子时，空气会迅速进入瓶内，会引起污染。因此，在灭菌过程中被打开的瓶子，应让它在灭菌环境中冷却至室温，例如，在拧紧盖之前将它保持在灭菌锅内，或放在超净台内。

15. 检测无菌指示剂确保已达到无菌条件，并在工作日志和自己的记录本中记录下来。

16. 在室温条件下将瓶子放进储存箱中。

17. 保存并使用 10×浓缩液制作的培养基（练习 10），然后用克隆形成实验（练习 20）或生长曲线进行比较（练习 15）。

QC 数据

数据采集：纯水器上的电阻（或电导率）测定仪和总有机碳（TOC）测定仪；高压灭菌锅的自动打印输出；试剂瓶上的灭菌指示胶条；中心试剂瓶中的无菌指示器。

记录：将读数和观察连同打印条记录于工作日志和你的笔记本中。

分析

回顾间隔 1 周、1 个月和 3 个月的记录本数据，注意观察水质量或无菌效果方面的趋势与变化。水质量的检测要先用水配制干粉培养基（参见练习 6）或稀释 10×浓缩培养基（参见练习 10），再通过生长曲线分析（参见练习 15）或克隆形成实验分析（参见练习 20）进行检测。

练习4 无Ca^{2+}和Mg^{2+}（D-PBSA）的Dulbecco磷酸盐缓冲液（D-PBS）的制备与灭菌

目的

等渗盐溶液的制备。

应用

用于稀释浓缩液（如稀释2.5%胰蛋白酶）、胰蛋白酶消化前的预漂洗、收集细胞或换试剂时的清洗溶液。因为它不含Ca^{2+}、Mg^{2+}、$NaHCO_3$或葡萄糖，所以不适合长时间孵育或用作培养基的平衡盐溶液。

训练目标

简单盐溶液的构成；等渗性；缓冲力和pH控制；利用高压灭菌锅消毒热稳定溶液。

监督：在配制溶液过程中连续监督，在质量控制步骤可以间歇监督。在灭菌开始和完成阶段连续监督，解读质量控制数据。

时间：2h。

背景信息

平衡盐溶液（参见8.3节，表8.2）；缓冲液（参见8.2.3节）。**标准方案：**D-PBSA的制备和消毒（参见方案10.6）。

示范材料与操作：渗透压计或电导率仪的使用，高压灭菌锅或台式高压灭菌器的指导使用。

▲安全提示 蒸汽灭菌锅有很高的灼伤风险和可能的消毒物品的爆炸风险（参见6.5.2节和6.5.7节）。简单的台式高压灭菌锅可能会烧干，因此有着火的风险，除非用自动的温度控制切断器来保护。

练习4说明

概要

连续搅拌溶解粉末，并制成最终容积，检验pH和电导率，分瓶后高压灭菌。

材料

非无菌

- D-PBS粉末（溶液A，不含Ca^{2+}和Mg^{2+}，如Sigma-Aldrich D5652），1L包装或片剂（Oxoid, Thermo Fisher），1份
- 超纯水（UPW；见10.4.1节）1L
- 容器

底部有出口的干净洗玻璃或塑料抽吸器，1L，1个

或Erlenmeyer烧瓶或培养瓶，蠕动泵和移液管，1L，1个

- 磁性搅拌器和涂PTFE的搅拌子，1个
- 用于储存的有刻度试剂瓶；硼硅酸盐玻璃瓶，100mL，1个

- pH 计
- 高压灭菌胶带或灭菌指示标签
- 高压锅

操作步骤

1. 加 1L UPW 到容器内。
2. 将容器放在磁性搅拌器上，将转速设为 200r/min。
3. 打开 D-PBSA 粉末包装或取出 10 块片剂，边搅拌边缓慢将它们加入容器中。
4. 搅拌直到完全溶解。
5. 检测样本的 pH 和电导率，记录在你的记录本中。
6. pH 的变化应该不会超过 0.1pH 单位（不同配方 pH 可能不一致）。
7. 从 150μS/cm 开始，电导率的变化不应该超过 5%。也可用渗透压检测替代（或补充）电导率检测，它们之间应该显示出相似的一致性。

注意事项 作为一个质量控制措施，核对参数保持一致是非常重要的，这样可确保制备过程无误。任何调整，如渗透压，应该在质量控制核对完成后进行。

8. 丢弃样本；不能加回到储存液中。
9. 将容器中溶液分装入刻度瓶中。
10. 盖上盖子，做好标注（日期、内容和你的签字），密封瓶子。
11. 贴上一小片高压灭菌标签或灭菌提示标签和日期。
12. 密封瓶用高压灭菌器在 121℃和 100kPa（1bar，15lb/in^2）灭菌 20min（图 10.3）。
13. 在室温储存。

QC 数据

采集：溶解组分后测量渗透压或电导率及 pH。

记录：在工作日志和记录本上记录时间和批号等。

练习 5 pH 标准色阶的制备

目的

准备一组培养瓶，与实验室通常使用的瓶子相似，含有简单带酚红培养基或盐溶液，调节其 pH 范围，使之处于培养中常见的 pH 范围。

应用

在制备培养基及换液或传代前用于估计 pH。

训练目标

熟悉酚红作为 pH 指示剂的使用。让实习生知道什么条件下不能使用，如荧光或类固醇受体分析。用注射式过滤器或高压灭菌，比较它们对 pH 的作用。

监督：开始时连续监督，在之后直到操作完成，可以减少监督。

时间：2h。

背景信息


彩版22

物理化学特征，pH（参见8.2节和彩版22b）。标准方案：pH标准色阶的制备（参见方案8.1），使用注射式过滤器过滤灭菌（参见方案10.10）。

示范材料或操作：pH计的使用，注射式过滤器的原理、应用及范围（图10.11a、b）

▲**安全提示** 只要在出口处不使用针头，就不会有安全问题。

练习5说明

概要

准备一系列装有BSS无菌样本的培养瓶，调整pH范围：6.5~7.8。

材料

无菌

- Hanks' BSS（HBSS）含有酚红，不含碳酸氢盐和葡萄糖，1L
- NaOH，1mol/L，100mL
- Erlenmeyer烧瓶，100mL，7个
- 培养瓶，25cm^2，14个
- 吸管，100~500μL
- 吸管头，粉红色
- 注射器，10mL，1支
- 注射式过滤器，25mm，1个

非无菌

- pH计
- 磁力搅拌器和1~2cm的磁力搅拌子

操作步骤

1．将HBSS分装至7个Erlenmeyer烧瓶中，每个100mL，贴上合适的pH标签。

2．在空气中平衡30min。

3．放在磁力搅拌器上轻轻搅拌。

4．用1mol/L NaOH调整7个Erlenmeyer烧瓶中的pH，使用pH计测定，分别调至6.5、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6和7.8。

5．每种HBSS过滤5mL至各个标记的培养瓶中（参见方案10.10），先用5mL冲洗过滤器，再收集5mL至培养瓶。

6．紧紧盖好培养瓶。

7．用铝箔盖好其他Erlenmeyer烧瓶，121℃灭菌20min。

8．待Erlenmeyer烧瓶在BSC内冷却后，从每个瓶中吸取5mL液体分别加入7个标记的25cm^{2}培养瓶中，用胶塞盖好每个培养瓶。

数据

资料采集：记录培养瓶中培养基的颜色并与酚红的 pH 标准色阶卡比对。

分析

（1）两组颜色相同吗？如果不同，请作出解释。

（2）换上可透气的盖子过夜，第二天比较培养瓶中液体颜色的变化。

（3）选择两组中的哪组或两组都使用。如果要使用高压蒸汽灭菌组，就要换可透气的瓶盖，使用平衡系列。

练习 6　以干粉配制培养基储液并过滤除菌

目的

制备复杂溶液及热不稳定试剂和培养基的除菌。

训练目标

过滤技术和容量范围的正确选择；正压和负压过滤的比较。

监督：指导培养基的制备。在过滤的初始阶段连续监督，在过滤过程中间歇监督，在抽样质量控制时连续监督。

时间：2h。

背景信息

以干粉配制培养基（参见 10.4.4 节）；过滤除菌（参见 10.5.2 节）。**标准方案：**培养基的制备与灭菌（参见方案 10.9 和方案 10.12）；选择步骤（参见方案 10.11、方案 10.12、方案 10.13）。补充方案：高压灭菌培养基的制备（参见 10.5.1 节）；可反复使用的除菌器（参见 10.3.6 节）；使用注射式滤器的过滤除菌（参见方案 10.10）；使用大型直线式过滤器过滤除菌（参见方案 10.13）；血清（参见 10.5.3 节，方案 10.16-Su）。

示范材料或操作：一次性滤器和可反复使用的滤器，最好有实物，如果没有，照片也可以。强调滤器尺寸（表面积）的概念。正压/负压滤器的原理和优缺点（参见 10.5.2 节）。示范滤器的操作，过滤、收集、抽样质控。

练习 6 说明

概要

用超纯水溶解粉末，过滤除菌，分装到试剂瓶，抽样进行无菌测试。

A. 用干粉配制培养基

这是第一阶段，完全溶解后立即无菌过滤。如果培养基在过滤前储存，必须保存在 4℃不超过 24h。

设备和材料

无菌

- 用于分装培养基的刻度培养瓶，100mL，10 个
- 瓶盖，10 个

- 用于污染质控取样的普通容器，3个

非无菌

- 超纯水，1L
- 干粉培养基，如含Earle盐的MEM，不含谷氨酰胺，1L
- 有刻度的锥形瓶或容量瓶，容量加上上部空间，1L
- 涂有聚四氟乙烯（PTFE）的磁力搅拌子，50mm，1个
- 电导率仪

操作步骤

1. 加适当体积的超纯水到容器中。
2. 加入磁力搅拌子。
3. 将容器放在磁性搅拌器上，并设定转速200r/min。
4. 打开袋装粉末，将粉末及添加剂缓慢加入容器，同时搅拌。
5. 搅拌直至粉末完全溶解。
6. 检验样本的pH及电导率并记录

(a) 特殊培养基的pH应控制在预定值的0.1单位之内。

(b) 特殊培养基的电导率应控制在预定值的2%之内。

7. 丢弃检测样品：不能重新放回储存培养基中。
8. 过滤除菌（参见下列及10.5.2节，方案10.10~方案10.13）。

B. 用真空过滤器除菌过滤

背景：CO_2和碳酸氢盐（参见8.2.2节）；缓冲液（参见8.2.3节）；标准灭菌方案（参见10.5节）。

概要

将真空泵连接出口，将培养基倒入过滤器的上室，开动真空泵，将溶液转入下室；盖上盖子储存。

材料

无菌

- 过滤瓶500mL（图10.10b，图10.11e），1个
- 用于下室的盖子（如果下室用作储存），1个
- 无菌测试所用的样本试管或普通容器，1个

非无菌

- 待灭菌培养基　450mL
- 真空泵或真空管
- 用于连接真空泵或真空管与滤瓶接口的厚壁连接管

操作步骤

1. 将准备灭菌的培养基和滤瓶放入BSC。
2. 将过滤器侧臂出口和真空泵相连接（放置在BSC外面，如地面上）。

3．移走培养瓶和过滤器上室的盖子。

4．将未灭菌培养基倒入上室。

5．开启真空泵。

6．摘下下室的盖子准备使用。

7．当所有液体进入下室，关闭真空泵，拆卸过滤器架和上室。

8．记录下室中的 pH，如果 pH 过高，则通入 5% CO_2，盖上盖子。

9．从下室中取出 10mL 液体到通用容器或试管中，标签上写上日期、内容及你的姓名首字母，37℃条件下孵育一周，检查污染。

10．在下室上贴上标签，写上培养基名字、日期和你的姓名首字母。

C. 用小型串联式过滤器除菌过滤

替代上述方案 B，为了达到训练目的，除了方案 B 之外应该做的。

概要

通过一个蠕动的泵从容器中抽吸培养基，并通过除菌过滤器将培养基分装到各个瓶中。

材料

无菌

- 带钟罩的串联过滤器（图 10.10a，图 10.11f），47mm
- 100mL 刻度的培养基瓶，铝箔包裹瓶口，干热灭菌（参见方案 10.1），7 个
- 盖子，高温高压灭菌（参见方案 10.3），6 个
- 用于无菌检测的取样试管或通用容器，1 个

非无菌

- 准备灭菌的培养基（来自程序 A），550mL
- 带底部开关的蠕动泵（图 10.14），1 个
- 为泵配备合适的硅酮管并插入过滤器，50cm
- 固定滤器的支架，1 个

操作步骤

1．将设备放进 BSC，适当擦拭。

2．接上蠕动泵。

3．将培养基放进 BSC，与管道出口相连接。

4．打开过滤器，与蠕动泵的下游出口相连接。

5．将过滤器固定在支架上，调整合适的高度，以便使回收培养基的瓶子位置低于带有瓶颈罩的过滤器，当瓶子装满时，容易被移开。用一个无菌培养瓶调试过滤器的高度，但最后不要用该瓶子收集无菌液体。

6．打开泵，收集 20mL 液体于调试的培养瓶中。

7．取出调试培养瓶，盖上盖，并编号“1”。

8．去掉下一个培养基瓶的铝箔，并将其放在过滤器的钟罩下。

9．打开泵。

10．注入瓶中至 100mL。

11．关上泵。

12．取出瓶，盖上盖子，标上序号，换上新的无菌培养基瓶。

13. 重复步骤8~11，将5个瓶子都装满100mL，收集余下的液体至最后一个瓶中。
14. 核对pH（通常用指示剂）。如果pH高，将所有瓶子上空充满5% CO_2，完成后，盖上盖。
15. 用铝箔包裹每个瓶子的瓶盖和瓶颈，保证储存时不会有灰尘进入。
16. 写标签，包括日期和签名。
17. 将装有100mL培养基的瓶子放在4℃储存（参见10.6.4节）。
18. 将第一个和最后一个瓶子封好，37℃孵育一周（参见10.6.2节）。

数据

（1）过滤前及过滤后立刻记录pH。
（2）普通容器或瓶子在37℃孵育一周，检查污染情况。

分析

（1）解释真空过滤和正压过滤培养基之间pH的区别。
（2）通入CO_2后pH会变化吗？
（3）如何选择过滤器？
（4）你将使用什么过滤器过滤下列溶液？
　（a）5mL透明溶液
　（b）10L培养基
　（c）1L血浆

实验变通

这个实验可通过以下一些实验变更。

（1）稳定性及储存：将装有正压过滤的100mL滤液的瓶子分别放置在–20℃、4℃、室温（约20℃）及37℃两周，再以生长曲线（练习15）或克隆形成实验（练习20）检查变质情况。

（2）水的纯化：使用练习3制备的3批无菌水来制备培养基，过滤除菌，之后再用生长曲线或克隆形成实验进行分析，将它们的结果进行比较。

27.3 基本的细胞培养技术

本小节的目的是给实习生讲解细胞培养、复苏、制备和无菌操作。多数情况下，实验主要是为了增加兴趣；此外，哪怕是简单的操作，也要鼓励实习生去观察、收集并记录数据。标准方案可作为参照为以后的实验做准备，而练习中的一些变化是增加了其他步骤，以此形成一个实验的基础。大多数资深操作员可能只想学习操作步骤，那么可直接进入标准方案。

练习7 培养细胞的观察

目的

细胞培养的严格检查。

应用

检查常规维持的一致性；评估培养物在换液、传代、冻存前的状况；对新条件或实验性条件的反应；对

明显污染物或错误鉴定及交叉感染的识别。

训练目标

熟悉不同类型和不同密度的细胞培养的外观；认识到错误鉴定和交叉感染的问题；显微镜和相机的使用；微生物污染和未受污染间的区别，健康和不健康培养物间的区别；评估培养物的生长阶段及是否需要更换培养基及传代培养。

监督：在观察中保持连续性，摄影过程可以间断。

时间：30min。

背景信息

形态学，摄影（参见 18.4 节和 18.4.5 节）。**标准方案：**显微镜使用及摄影（参见方案 18.1 和方案 18.5）。**补充方案：**染色（参见方案 18.2 和方案 18.3）；细胞离心法（参见方案 18.4）；间接免疫荧光（参见方案 18.6）。

示范材料或操作：不同密度下细胞形态的摄影照片，活细胞培养物的相差观察，固定和染色准备；以后练习中使用的细胞染色照片；适用于形态学研究的培养器皿的类型，如培养皿（图 7.4）、培养小室载玻片（图 18.3）；用于悬浮培养物的细胞离心机（图 18.4）。

练习 7 说明

概要

观察一系列不同密度的细胞并摄影。

设备和材料

- 培养瓶或培养皿中一系列不同密度的细胞，最好是同一正常或转化的变异细胞（如 3T3 和 SV3T3，或 BHK21-C13 和 BHK21-PyY）的不同密度，包括中对数期（大约 50%汇合，有明显的有丝分裂）、汇合（细胞覆盖了 100%的生长面积，但没有堆积）及汇合后期（细胞多层生长，如果是转化细胞，有堆积）。如果可能，最好有低浓度和高浓度的悬浮细胞
- 如果可能，最好有已污染的培养物样本（最好不要是培养皿，避免扩散风险）和不健康培养物，如很长时间没有换液的细胞
- 倒置显微镜，配有 4×、10×和 20×相差物镜及聚光器
- 自动相机，最好是带监控器的 CCD，或带 K-固定和摄影目镜的数码单反相机（SLR）

操作步骤

1．打开显微镜，调节灯光强度和中心相位（参见方案 18.1）。

2．从孵箱中取出培养物。最好在同一时间检查少许培养瓶，而不要将很多培养瓶长时间放在孵箱外。例如，取出一对培养瓶，低密度和高密度的同一细胞，或同一细胞类型的正常和转化状态。

3．用肉眼观察每一个培养物，注意培养基的浑浊度、pH 是否下降、颗粒、空泡或漂浮的细胞。辨识单层细胞，寻找排列的特征。例如，正常情况下，成纤维细胞汇合时呈漩涡图形，而转化细胞生长乱而没有图形。

4．在倒置相差显微镜低倍镜下观察（4×物镜）细胞密度和细胞间相互作用的特征、聚集或分离。

5．在中倍（10×物镜）和高倍（20×物镜）物镜下观察细胞的健康状态、聚拢特征、单层细胞的收缩或分离。还要观察细胞的形态特征，是否为正常成纤维细胞的生长、是否有细胞聚集、杂乱地过度生长及其他转化的证据。

6. 观察有无微生物污染特征。

7. 检查培养同质性；不均一性可能表示基因不稳定、转化或有交叉污染。

8. 寻找有丝分裂并粗略估计发生频率。

9. 给每一种培养物照相，注意培养物细节（细胞类型、最后一次传代时间）和细胞密度，并比较相同细胞的记录图片，确保这些细胞没有任何改变或交叉污染。

10. 将培养物放回孵箱，取新的培养物重复以上步骤。

观察并记录

（1）寻找相关培养物生长模式、细胞密度和形态学方面的差异（表 27.2）。它们与存档照片的细胞有无差别？是否意味着有新变化（转化、异质性、错误识别或交叉污染）？

表 27.2 培养物观察：检查项目

状态	标准	记录	反应措施（另见第 28 章）
外观	形态学		与相同细胞密度的存档照片对比
	密度		与培养阶段如期望密度进行比较。如果高于或低于期望密度，检查并调整接种浓度
	有丝分裂		显示增殖。除非没有细胞分裂，不然不需要采取任何措施，但要检查生长条件
	生长不佳		检查污染（参见 14.3 节）
			检查生长条件并校正
			丢弃并重新从储存库或冻存中取得细胞
	变异、转化		丢弃或重新从储存库或冻存中取得细胞
	异质性（混合细胞类型的证据）		与存档照片对比。检查同一性和真实性（参见方案 13.1，方案 18.2 和方案 18.3）
	污染		丢弃使用过的培养物、培养基和试剂（参见 14.4 节）
			如果反复或广泛扩散则需鉴别并清除来源（参见 14.1 节，28.5 节）
维持	细胞密度/浓度		如果过高，传代培养
	培养基 pH		如果过低，依据细胞密度/浓度换液或传代培养
			如果过高，检查培养瓶是否密封、孵箱中 CO_2 浓度、是否污染
			如果所有培养物 pH 过高，检查培养基的制备

（2）评估细胞的健康状态。

（3）有无污染的迹象？

（4）细胞是否需要换液（参见 12.4.2 节）或传代（参见 12.5.1 节）？

（5）通过计算 20×物镜视野的面积和计数每个视野中的细胞数来量化估计细胞密度。如果使用数码相机和监控器就会变得很简单，可以用薄膜覆盖屏幕，用记号笔给每个细胞做标记。通过练习很容易“估算”细胞密度。如果你通过这一阶段的其他特征不能算出细胞数量，这种方法就变得非常重要（参见 12.5.3 节）。

（6）在高倍视野中尝试鉴别和统计处在有丝分裂中的细胞。

数据

定性

（1）记录所有培养物在形态学、外形和生长形式方面的观察结果。
（2）注意任何污染物。
（3）确定健康或是不健康的生长状态。

定量

（1）记录每一个培养物的细胞密度（个/cm^2）。
（2）记录每一个培养物的有丝分裂指数。

分析

（1）解释说明细胞密度的不同。
（2）解释说明有丝分裂指数的不同。
（3）比较正常和转化细胞，以及高密度和低密度细胞外观，并试解释行为上的不同。

练习8　制备无菌培养基

目的

用1×工作浓度储存培养基及补充成分配制完全培养基（准备使用）。

训练目标

无菌操作：熟悉无菌操作；简单培养基的配制。

监督：连续。

时间：30min。

材料及操作示范：示范如何擦拭工作桌面和将物品拿入BSC。解释层流超净台和空气微粒过滤器的工作原理。给实习生示范如何打开和盖上培养瓶和试剂瓶的瓶盖，以及如何在工作面上摆放盖子。示范如何握持吸管，将其插入移液器，如何使它不碰到任何未灭菌的东西以免被污染，如何在无菌条件下转移液体，如何在移液时倾斜试剂瓶和培养瓶（参见5.1~5.4节）。强调清理和擦拭BSC并检查工作桌面下方。

背景信息

无菌技术的目标（参见5.1节）；无菌环境的要素（参见5.2节）；无菌操作（参见5.3节）；在层流超净台工作（参见5.4节）；可见的微生物污染物（参见14.3.1节）。**标准方案：**灭菌技术（参见方案5.1或方案5.2），用1×储存液配制培养基（参见方案10.7）

练习8说明

概要

确认组分：如果是完全培养基，可直接使用，如果需要可加入血清（参见8.6节）。如果组分是不完全培养基（如缺谷氨酰胺），就加入相应的浓缩液。

注意事项　补充成分（如血清或抗生素等）是一种添加到培养基的成分，不是原始的组成成分，在所有

的实验记录或发表的文章中要注明。其他一些附加成分（谷氨酰胺或 $NaHCO_3$ 等）是培养基的组分不是补充成分，不需要在实验记录或发表的文章中注明，除非它们的浓度有改变。

材料

- 培养基母液（如 Eagle's MEM 含有 23mmol/L $NaHCO_3$，不含谷氨酰胺），100mL
- 谷氨酰胺，200mmol/L（需要解冻），20mL
- 血清（需要解冻），新生牛或胎牛血清，100mL
- 移液管和其他设备，见无菌技术列表（参见方案 5.1、方案 5.2）
- 培养瓶，25cm^2，或培养皿，直径 5cm 或 6cm

操作步骤

1. 将谷氨酰胺和血清（如果冷藏）放入盛有洁净灭菌水的水浴中。
2. 检查培养基组分，并决定需要添加什么，如谷氨酰胺。
3. 将培养基和所需的添加物放在 BSC 内。
4. 如果是用聚乙烯包裹的瓶子，打开包装后用 70%乙醇擦拭。
5. 打开瓶盖。
6. 每种添加物吸取适量转移至母液瓶中做正确的稀释，如 100mL，加入下列添加物：
   谷氨酰胺，200mmol/L，1mL
   血清，10mL（占 10%）
7. 每种添加物使用不同的移液管。
8. 每加完一种添加物，将其放在 BSC 的另一侧，以便提醒自己那是刚加过的成分。
9. 重复步骤 6，但不加血清。
10. 当培养基配制完成，将所有添加物和补充物从 BSC 移走。
11. 用含 5%的 CO_2 充满空间，含有血清的任何培养基都不要起泡，不然气泡会溢至瓶颈，导致污染。
12. 重新盖上瓶盖。
13. 变更标签记录添加物、日期和签名。
14. 用移液管转移 5mL 液体到 25cm^2 培养瓶或 6cm 培养皿中，在 5% CO_2 孵箱中孵育过夜，确定 pH 在适当范围内。如果不在此范围内，用灭菌 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调节 pH，再孵育 1h。使用 10μL 移液器调节 pH，加至培养瓶或培养皿中，累计加的量决定培养基母瓶所需的量。
15. 吸取 10mL QC 样本到普通容器或培养瓶中并在 37℃孵育 1 周。
16. 将剩余培养基放在 4℃保存直到证明是无菌的（如果有经验，此步可省略），用于练习 9。

观察并分析

（1）比较至步骤 11 无血清和含血清之间的差异，加入一定量酸或碱调节 pH 到正常范围。

（2）检查 QC 样本在 24h、1 周和 2 周的污染情况。

练习 9　单层细胞培养的换液

目的

为单层细胞培养更换新的培养基。

应用

用于给快速生长的培养物在传代之间更换培养基，或从一种类型培养基换成另一种培养基。

训练目标

加强无菌操作技巧；介绍细胞维持的一个基本原则，即在繁殖周期更换培养基；让实习生观察培养物并明白耗竭培养基的特征，如细胞密度和（或）pH降低，并观察有无污染，了解交叉污染的风险。

监督：向实习生说明耗竭培养基的特征，并示范操作吸取和更换培养基。

时间：30min。

背景信息

完全培养基（参见8.4节）；更换培养基（参见12.4.2节）；监控污染物（参见14.3节）；交叉污染（参见13.1.1节）。**标准方案**：单层细胞培养的换液（参见方案12.1）。**补充方案**：完全培养基的制备（参见方案10.7、方案10.8或方案10.9及练习6、练习8）；pH标准色阶的制备（参见方案8.1）；培养皿或培养板的操作（参见方案5.3）。

示范材料和操作：练习需要至少三瓶半数汇合的连续培养细胞系，如HeLa或Vero细胞，并且要标明接种时间和数量。给实习生示范如何从冰箱取培养基，并要强调一瓶培养基仅限用于一个细胞系，不能与其他细胞系混用或操作。还要示范如何擦拭和整理BSC、孵箱的使用、将培养物放回孵箱、用肉眼并在显微镜下观察细胞的状态（参见练习7和方案12.1、方案18.1）。需要真空泵吸弃培养基或用废液烧杯，在培养基的吸取和更换过程中如需要可补充5% CO_2。

▲安全提示 如果操作人源细胞，需要使用Ⅱ级BSC，废弃的培养基必须注入消毒液缸内（参见6.8.6节，表6.8）。

练习9说明

概要

用肉眼和倒置显微镜观察培养物，如果有迹象，如pH下降，弃去旧培养基，加入新鲜培养基。将培养物放回孵箱。

材料

无菌

- 细胞培养：A549细胞（或类似的快速生长的单层细胞系），每25cm^{2}培养瓶接种2×10^4个/mL，培养4天，6份
- 生长培养基，含血清和不含血清，每种约100mL
- Eagle's 1×MEM加入23mmol/L HCO_3，±10% FBS，无抗生素，来源于练习8
- 有刻度、加棉塞的吸量管，如果是玻璃的，分为1mL、5mL、10mL、25mL，放入方形吸管筒中，如果是塑料移液管，独立包装的，按大小放在支架上
- 如果用真空泵，则吸管不要塞棉花

非无菌

- 移液管调节器或吸球

- 将真空管与接收容器或通过蠕动泵与接收容器接通
- 70%乙醇，喷雾瓶
- 不含棉绒的棉球或试纸
- 吸纸片
- 含有水和消毒水的移液管收集筒
- 含有乙醇不溶性的墨水记号笔
- 笔记本，笔，方案

操作步骤

1. 确保BSC干净，用70%乙醇擦拭。
2. 将实验过程所需的试剂、70%酒精棉球瓶及其他所需物品放入BSC。
3. 仔细检查培养物有无污染和变质迹象。
4. 检查先前描述的标准——pH 和细胞密度或浓度，根据你对细胞培养行为的了解，确定是否需要更换培养基。
5. 取出3个培养瓶放到无菌工作区并将其余3个培养瓶放回孵箱。
6. 打开培养瓶瓶盖。
7. 取出移液管将其插入吸球或移液管控制器，或选择一只不带棉塞的移液管连接到真空或真空泵。
8. 从4个培养瓶中吸出培养基，将其弃入盛废液的烧杯中；或最好连接到外部的真空泵，通过BSC上一根吸管线吸出培养基。
9. 丢弃移液管。
10. 打开培养基瓶。
11. 取出一只新的移液管，加5mL 新鲜的含血清的培养基到2个培养瓶，并加5mL 不含血清的培养基到另2个培养瓶，剩下2个培养瓶不加新的培养基。
12. 丢弃移液管。
13. 重新盖上培养瓶和培养基瓶。
14. 将培养物放回孵箱。
15. 将观察及换液记录填入记录表或实验室记录本。
16. 清理所有移液管、玻璃器皿及其他物品，将工作台擦干净。
17. 24h、48h和72h后检查培养物，培养72h者用于练习11。

观察并分析

记录72h的细胞密度及细胞形态，用于细胞计数（参见练习11），并比较各培养瓶的细胞产率。

数据

比较细胞形态（参见练习7）及细胞产率（参见练习11）。

常规维持的应当记录在一张记录表上（参见表12.7），实验数据记录在练习11的记录表上。

练习10　用10×浓缩液配制完全培养基

目的

向水中添加浓缩液和补充成分来配制特殊需要的完全培养基。

应用

生长培养基用于细胞增殖，维持培养基用于简单维持细胞的生存，分化培养基用于细胞在正确的诱导因子存在下的分化。

训练目标

进一步熟练无菌操作，提高对培养基组分、补充物成分、水质、用 $NaHCO_3$ 调节 pH 的理解。

监督：实习生如果很好地通过了练习 8，则可以较少监督，但需明白使用添加剂和补充成分的必要性，并从价格和灵活性方面体会使用的 1×培养基。依据各实验室相关的实验来选择步骤 A、B 或 C。

时间：30min。

背景信息

培养基（参见 10.4.3 节、10.4.4 节）。**标准方案**：用 10×浓缩培养基来制备（参见方案 10.8）。**补充方案**：用粉末制备储存培养基并过滤灭菌（参见方案 10.9）；制备 pH 标准色阶（参见方案 8.1）。

示范材料和操作：一套 pH 标准色阶（参见方案 8.1），用于制备培养基的各种试剂瓶。

▲**安全提示** 除了添加有毒物质（如霍乱毒素或细胞毒性药物）或放射性成分之外，没有特别的安全提示。

练习 10 说明

概要

加浓缩培养基和其他成分，调节 pH，使用溶液或将其放回冰箱。

材料

容量为 500mL 的培养基，但是储存培养瓶中培养基应多于这个数量，表明足够吸出使用。

- 移液管和其他拿出的物品按无菌技术处理（参见练习 1），同时要考虑下列容积的需要。

A．使用密封的培养瓶，以空气为气相环境。低浓度 HCO_3^-，大气 CO_2 浓度，低缓冲力

无菌溶液

- 预先分装的 UPW，443mL
- 培养基，10×浓缩，如含有 Hanks 盐的 Eagle's MEM，50mL
- 谷氨酰胺，200mmol/L，5mL
- $NaHCO_3$，最终浓度为 4mmol/L，7.5%，5mL
- 新生牛或胎牛血清，50mL
- NaOH，1mol/L（根据需要）

操作步骤

1. 解冻血清和谷氨酰胺并拿到 BSC 内。
2. 擦拭曾保存在水浴锅中的试剂瓶，再将其放入 BSC 内。

3. 加入本练习“材料”中“无菌溶液”所列成分。加入 HEPES 能够帮助增加缓冲能力，某些细胞系在较高细胞密度下会产生许多酸性物质，在大气压下会排出。

4. 加 1mol NaOH 在 20℃调节 pH 至 7.2。37℃孵育时，培养基 pH 将升高至 7.4，但如果是第一次使用的配方，该数值可能需要通过滴定来核实。

B. CO_2 孵箱中开放式培养，或在密封培养瓶中充 CO_2，5% CO_2，高浓度碳酸氢盐

无菌溶液

- 预先分装的 UPW，443mL
- 培养基，10×浓缩，如含有 Earle's 盐的 Eagle's MEM，50mL
- 谷氨酰胺（需要解冻，终浓度为 2mmol/L），200mmol/L，5mL
- $NaHCO_3$，终浓度为 26mmol/L，7.5%，14.5mL
- 新生牛或胎牛血清，50mL
- NaOH，1mol/L（根据需要）

操作步骤

1. 解冻血清和谷氨酰胺并拿进 BSC。
2. 擦拭曾保存在水浴中的试剂瓶，再将其放入 BSC 内。
3. 加入上述“无菌溶液”所列成分。
4. 加 1mol/L NaOH 在 20℃调节至 pH 7.2。37℃孵育时，培养基 pH 将升高至 7.4，但如果是第一次使用的配方，该数值可能需要通过滴定来核实。
   (a) 取 5 个培养皿，各加 5mL 培养基。
   (b) 每个培养皿中加 5~50μL NaOH。
   (c) 在 5% CO_2 下孵育 2h，最好过夜。
   (d) 加适当数量 1mol/L NaOH 到整个试剂瓶中（约 100×）。

C. CO_2 孵箱中开放式培养，或在密封培养瓶中充 CO_2，2% CO_2，中等浓度碳酸氢盐

无菌溶液

- 预先分装的 UPW，443mL
- 培养基，10×浓缩（如 Ham's F12），50mL
- 谷氨酰胺（需要解冻，终浓度为 2mmol/L），200mmol/L，5mL
- $NaHCO_3$，终浓度为 26mmol/L，7.5%，9mL
- HEPES，终浓度为 20mmol/L，1mol/L，10mL
- 新生牛或胎牛血清，50mL
- NaOH，1mol/L（根据需要）

操作步骤

1. 解冻血清和谷氨酰胺并置于 BSC 内。

2．擦拭曾保存在水浴中的瓶子，再将其放入BSC内。

3．加入上述“无菌溶液”所列成分。

4．加1mol/L NaOH在20℃调节至pH 7.2。37℃孵育时，培养基pH将升高至7.4，但如果是第一次使用的配方，该数值可能需要通过滴定来核实。

实验变通

水质（继续练习3）

1．使用练习3中的水：UPW、去离子水和自来水。

2．用A、B、C三种操作之一制作三批培养基。

3．储存在4℃用于以后的实验［练习15和（或）练习20］。

培养瓶的通气

1．按照方案A准备培养基。

2．用移液管吸取5mL培养基分别加到4个$25cm^2$培养瓶中。

3．取2个培养瓶，分别加入10μL 1mol/L HEPES。

4．密封两个培养瓶，一个含有HEPES，一个不含有HEPES，将另外两个培养瓶瓶盖拧松（或者用一个可透气的培养瓶）。

5．在不含CO_2、37℃环境下孵育过夜。

6．记录pH，将其和孵育条件一起填入表格。

通气和不通气培养瓶的分析

（1）检查pH并解释差别的原因。

（2）什么条件最适合这种低碳酸氢盐培养基？

（3）HEPES在稳定pH方面有什么作用？

（4）什么时候通气是正确的？

碳酸氢盐浓度

1．去掉方案B中的碳酸氢盐，按照如下添加$NaHCO_3$。

2．在5个$25cm^2$培养瓶中各加入10mL无碳酸氢盐的培养基并做好标记。

3．分别加200μL、250μL、300μL、350μL和400μL 7.5% $NaHCO_3$到各个培养瓶中。

4．将培养瓶瓶盖拧松（刚刚扣在螺齿上）或者用一个可透气的培养瓶，放在37℃、5% CO_2的培养箱中。

5．放置过夜，用pH标准色阶来判断pH。

6．记录pH并根据加入$NaHCO_3$的量制表。

分析

1．解释为什么pH发生了改变。

2．计算每个培养瓶中$NaHCO_3$的最终浓度并确定正确的使用量。

3．如果一个都不正确，那如何来达到正确的pH?

练习11　用血细胞计数板或电子计数器计数细胞

在这个练习中有许多选项。它可以作为使用血细胞计数板或电子细胞计数器的练习，也可以作为衔接练习，使用了技术又比较了实验结果。其中一个或两个选项可以和练习12或练习13联合使用。在细胞计数训练开始的

时候实际计数的过程会很慢，细胞计数作为单人练习，推荐利用前面练习操作过的培养物来进行（例如，来自练习9的培养物），而不必作为另一个练习的准备步骤。下面的描述中将包含两种计数方法的联合使用。

目的

量化悬浮细胞的浓度。

应用

常规传代中细胞浓度的标准化；定量生长实验和通过生长曲线及细胞产量所反映的细胞生长分析。

训练目标

定量技巧。计数细胞和评价细胞活力；评论血细胞计数板和电子计数器的相对优缺点。

监督：在样品准备和检查及计数步骤中需要监督。计数样本的过程无需监督，实习生分析数据的时候可能需要帮助。

时间：45min。

背景信息

用血细胞计数板（参见23.1.1节）、电子计数器（参见23.1.2节）进行细胞计数；通过染料排除法估算存活率（参见24.3.1节）。**标准方案**：血细胞计数板计数（参见方案23.1）；电子计数器计数（参见方案23.2）；染料排除计算存活率（参见方案24.1）。

示范材料和操作：用于细胞计数的培养物提供给实习生用于实验。示范血细胞计数板和电子计数器的使用，同时对最后如何计算出结果作出正确指导。需要解释电子计数器的操作原理。

▲安全提示 如果操作人源细胞系，需在Ⅱ级生物安全柜中操作。所有的塑料制品和玻璃器皿，包括血细胞计数板和盖玻片，在使用后需浸泡在消毒剂中，操作电子计数器时使用的计数杯和液体也需要用消毒剂处理（参见6.8.6节）。

练习11说明

概要

胰蛋白酶消化的单层细胞或使用悬浮细胞样品，准备一个血细胞计数板，将细胞加入计数室。显微镜下计数细胞并计算细胞浓度。用电子计数器再次计数，以电解液稀释细胞并置于样本位。

材料

无菌

- 计数用细胞，从实验9取得的胰蛋白酶消化的单层细胞（之前换液或未换液）重悬于1mL
- 适合细胞类型的培养基，20mL
- 胰蛋白酶，0.25%，5mL
- D-PBSA，10mL
- 黄色移液吸头

非无菌

- 活性染液（溶于D-PBSA或HBSS的0.4%锥虫蓝或1%萘黑），1mL

- 加样器，20μL 或可调节的 100μL
- 血细胞计数板（改良的 Neubauer）
- Tally 计数器
- 显微镜（正置或倒置）
- 电子计数器计的计数杯

A. 用血细胞计数板计数细胞

1. 细胞样品（按照练习 13 中的步骤 1~10 操作）。

    (a) 充分混匀悬液，分散细胞。

    (b) 转移少量样品（如 1mL）至玻璃管或普通容器中，剩下的用于方案 B 中的电子计数。

    (c) 加入等量活性染液至细胞样品中。

2. 准备载玻片：

    (a) 用 70%乙醇擦拭载玻片的表面，注意不要在其半镀银的表面留下划痕。

    (b) 清洗盖玻片并轻轻地弄湿每个边缘，把它盖在凹槽上或半镀银的计数区。在载玻片和盖玻片之间出现干扰图像（“Newton’s 环”——在盖片和载片间出现彩虹颜色，类似油在水面出现的圈），说明盖玻片的贴符是合适的，它决定了计数室的深度。

3. 充分混匀细胞样品，使劲吹打分散所有的细胞团块，并用加样器小吸头吸取 20μL 液体。

4. 迅速将细胞悬液加到血细胞计数室的边缘，通过毛细管作用让细胞悬液流到盖玻片下。不要溢出或没有装满小室或其他，否则由于表面张力的变化会使其体积有所改变，液体只应该到达槽的边缘。

5. 混匀细胞悬液，重吸，然后装满第 2 个小室。

6. 吸干所有剩余的液体（不要从盖玻片下吸出），将计数载玻片转移到显微镜载物台。

7. 选择一个 10×物镜，让焦距对在小室一排排格子上。如果聚焦困难说明对比度较弱，关闭视野可变光阑，或偏移聚光器使光线稍微倾斜。

8. 移动载玻片使你看到的区域是格子的中心区域，而且你通过 3 个平行线能看到的范围是最大范围。该区域为 1mm^2，用 10×物镜观察，这个范围几乎充满了视野；或者根据观察的范围，边角略微移出视野。

9. 计数平铺在 1mm^2 区域的所有细胞，利用更细的划分区域（每个区域被 3 条平行线划分）及线网格帮助计数处于 1mm^2 区域的所有细胞。为了避免重复计数，压线的细胞只计数压左线和压上线者。常规传代培养，每平方毫米 100~300 个细胞；计数的细胞较多，计数结果越精确。若要进行精确定量实验，应该计数 500~1000 个细胞。

10. 如果细胞数很少（＜100 个/mm^2），多计数中心大方格周围一个或更多的方格（每格 1mm^2）。

11. 如果细胞数过多（＞1000 个/mm^2），只计数大方格（1mm^2）对角线上的 5 个小格（每个小方格被 3 条平行线划界分隔）。

12. 再次计数，只计数染色细胞。

13. 如果载玻片有两个小室，可以将第二个小室移入视野进行第二次计数。冲洗计数板，用新的样本再次计数。

分析

从总数中减去染色细胞的数量，将未染色的细胞数量用总数的百分率表示。计算两种数量的平均值，并以样本计算公式推导出浓度。

$$c=n/v\times 2$$

式中，c 是细胞的浓度（个/mL）；n 是数过的细胞数量；v 是计数细胞的体积（mL）；2 是活性染色稀释倍数。由于用的是改良的 Neubauer 计数板，小室深度是 0.1mm，假设只计数中心 1mm^2，则 v 是 0.1mm^3 或

1×10^{-4}mL。上述公式变为

$$c=n/10^{-4}\times2 \text{ 或 } c=n\times10^{4}\times2$$

如果细胞浓度很高，则需计数在中心 $1mm^2$ 大方格对角线上的 5 个小方格（即总数的 1/5），公式变为

$$c=n\times5\times10^{4}\times2 \text{ 或 } c=n\times10^{5}$$

如果细胞浓度很低，计数 9 个 $1mm^2$ 大方格，每块板每个小室中的 5 个方格，公式变为

$$c=n\times10^{4}/9 \text{ 或 } c=n\times1.1\times10^{3}\times2$$

这是经胰蛋白酶消化后的细胞悬液中细胞浓度（或最初提供的细胞浓度），但要确定每个培养瓶中的细胞数，还要乘以用于重悬细胞所用的培养基体积（细胞样本设定的体积）。将此细胞数除以最初培养瓶中的培养基体积（此例为 5mL），就可以确定培养细胞的浓度；若除以培养瓶表面积（此例为 $25mm^2$），就可确定培养细胞的密度（只用于单层细胞）。

B. 用电子计数器计数细胞

1. 用加样器吸取方案 A 中剩余的细胞，充分混匀并形成单个细胞悬浮。
2. 在 25mL 烧杯或一次性样本培养杯中，按照 1∶50 稀释，即 0.4mL 加至 20mL 计数溶液中，成为细胞悬液样本。自动分配器可加快细胞稀释分布并增强重复性。

注意事项 快速分散溶液易产生气泡，当它通过锐孔时也将被计数。因此，在计数前计数溶液应放置一会儿。如果先加分配液然后加入细胞，问题就会少一些。

3. 充分混合悬液，并将其放在锐孔管尖的下方。确保盖过锐孔板，外电极线浸没在样本烧杯的计数溶液中。
4. 检查程序设置。
5. 阈值设定（最小细胞大小，通常 7.0μm）。
6. 要计数的体积（通常 0.5mL）。
7. 背景扣除（如果需要用的话）。
8. 稀释设定（例如，如果在 20mL D-PBSA 中计数 0.4mL，设定为 50）。
9. 核对视觉模拟显示：
   (a) 确保所有细胞在阈值设置范围内。
   (b) 检查细胞活力和细胞碎片（通过曲线肩部或正常阈值下限以下的直方图来指示）。
   (c) 检查细胞团块状态（以在正常大小范围之上的颗粒来显示）。
10. 起始计数程序。
11. 当计数循环完成，大小分布将出现在模型屏幕上（图 20.4）。转换到数字屏幕将给出每毫升的细胞计数。

使用其他电子细胞计数器，参照制造商的用法说明，有些计数器有一个细胞活力测定仪，可以与血细胞计数板比较。

实验变通

（1）用血细胞计数板和电子计数器重复计数新鲜细胞 5~10 次，计数平均值和标准差。

（2）与练习 9 的结果相比较。

数据

计算细胞计数，正确判断细胞死活情况下，各种计数方法计数每一瓶细胞数。在记录表（表 12.7）中记录常规维护的细节，在单独列表中记录实验数据（表 27.3）。

表 27.3　练习 11 的数据记录：细胞计数

每个培养瓶接种细胞数	收集细胞时用血细胞计数板或电子计数器计数结果	稀释倍数或取样分数[a]	消化的或悬浮的细胞浓度（个/mL）	每个培养瓶收集到的细胞数	产率：收集细胞数/接种细胞数

a 电子计数器需稀释 50 倍（例如，0.4mL 细胞悬浮液稀释于 20mL 计数液），如果计数样本为 0.5mL，就需要乘以 100。血细胞计数板的计数室（改良的 Neubauer）通常是 $1mm^2 \times 0.1mm$ 深，也就是 $0.1mm^3$，所以计算每毫升细胞数时需乘以 1×10^4（参见 23.1.1 节）

分析

（1）记录活细胞产量并将这些细胞接种到培养瓶中（参见练习 9 细胞接种数量）。

（2）更换新的培养基，细胞产量有什么不同？如果有不同？原因是什么？

练习 12　悬浮生长细胞的传代

目的

根据生长速率按比例减少细胞浓度，使得细胞保持指数生长状态。

应用

非贴壁细胞，如骨髓瘤或腹水培养物的常规传代；扩大培养以增加细胞产量和产物收获；为了实验目的而设置多份相同培养物；扩大储存用于低温保存。

训练目标

熟悉悬浮生长模式；细胞计数和生存力评价。

监督：开始时需要解释原理，由于操作简单，如果实习生已经完成练习 11 中至少一种计数方法，则不需要连续监督，无菌操作时需要不时检查。

时间：30min。

背景信息

悬浮培养，悬浮培养物的传代（参见 12.5.4 节、12.5.5 节）；生存力（参见 24.3.1 节）；传代时细胞浓度（参见 12.5.3 节）。**标准方案**：悬浮细胞的传代（参见方案 12.5）。**补充方案**：悬浮细胞的规模培养（参见方案 21.1）。

示范材料或操作：实习生需要两瓶悬浮培养物，一瓶处在指数后期，一瓶处在平台期，标明接种日期和细胞浓度，使用血细胞计数板计数时需要示范如何进行活细胞鉴别（参见 23.1.1 节、24.3.1 节，方案 24.1）。如果更多地使用搅拌培养而不是静态培养，则需要示范培养瓶的准备和搅拌平台的使用。

▲安全提示　如果操作人源细胞系，需在Ⅱ级生物安全柜中操作，所有材料需要用消毒剂处理。

练习 12 说明

概要

取出细胞悬液样本，计数细胞，在新的培养瓶中接种适当体积的细胞悬液到新鲜培养基中，稀释细胞浓

度到最初接种水平。

材料

无菌

- 最初培养：在 $25cm^2$ 培养瓶中接种细胞，1×10^4 个/mL，加入 HL-60、L1210 或 P388 细胞，培养 5 天和 10 天，$25cm^2$ 培养瓶，1 个
- 生长培养基，如含有 Spinner 盐的 Eagle' MEM（S-MEM），或 RPMI1640，含有 23mmol/L $NaHCO_3$，加入 5%牛血清，200mL
- 移液管，刻度加棉塞的，每种 1 筒
- 如果是玻璃的，则装在正方形移液管筒中，各种大小即 1mL、5mL、10mL、25mL；如果是塑料的，独立包装的，按照大小存放在架子上或筒中
- 如果使用泵或真空管，用于吸取培养基的不加棉塞的移液管，1 筒
- 普通容器或 50mL 离心管，4 个
- 搅拌培养瓶，带有磁力摆动搅拌器的 500mL 瓶（Techne，Bellco），2 个
- 培养瓶，$25cm^2$，2 个

非无菌

- 移液管控制器或吸球
- 接通与真空管或蠕动泵相接的接收容器
- 70%乙醇，放入喷雾瓶中
- 不含棉绒的棉签或拭纸
- 吸水纸
- 装有水和消毒剂的移液管收集筒
- 乙醇不溶性墨水标记笔
- 血细胞计数板或电子细胞计数器
- 磁力搅拌器
- 笔记本、笔、实验记录等

操作步骤

1. 准备 BSC，在进行实验前将试剂和材料放入 BSC 内。

2. 通过肉眼检查培养物污染或变质情况（pH 下降、细胞聚集、表面浮垢、真菌菌丝体或孢子）。这一步悬浮培养物的操作比单层细胞更难一些，因为悬浮的细胞可造成培养基浑浊。

3. 通过显微镜观察：细胞在缺乏营养的情况下会皱缩、边缘不规则或呈现颗粒。健康细胞看起来干净透明，相差下可见细胞核，在静态培养条件下经常看到小细胞簇。

4. 将培养物放到无菌工作台，吸取样本，计数细胞。

5. 依照之前的描述标准及你的培养物行为的知识，决定是否传代。如果需要传代（练习 12），过程如下。

6. 混合细胞悬浮物，通过用移液管反复吹打细胞悬液分散细胞团并计数细胞（参见练习 11）。

7. 两个搅拌培养瓶中分别加 50mL 培养基。

8. 两个 $25cm^2$ 培养瓶中分别加 5mL 培养基。

9. 加足够数量的细胞达到终浓度 1×10^5 个/mL 用于缓慢生长的细胞（36~48h 时间加倍）或 2×10^4 个/mL 用

于快速生长的细胞（12~24h 时间加倍）。若取自“材料”中所引用的细胞，细胞终浓度为 1×10^4 个/mL。

10．用 5% CO_2 充满培养瓶空间。

11．盖上培养瓶，将其放入孵育箱。若为单层细胞培养，将培养瓶平放。

12．盖上搅拌培养瓶，置于磁力搅拌器上，设置 60~100r/min，放入 37℃孵箱或温室中。注意磁力搅拌器温度不能高于培养物。如果需要，可在瓶底插入一个聚苯乙烯泡沫垫。感应驱动搅拌器产生热量较少，而且其部件不能移动。

13．3 天后从培养瓶和搅拌瓶中取样并计数细胞，检查其存活率。

数据

测定指数期和传代 72h 后平台期细胞的浓度及活力。按表格中做好记录（表 27.4）并将其转换成电子表格。

分析

（1）按表 27.5 所述计算细胞产率。

（2）比较指数期和平台期细胞接种后的细胞产率。

（3）比较培养瓶和搅拌培养瓶中细胞生长状况。

表 27.4　练习 12 的记录：悬浮生长细胞的传代

样品	培养瓶中细胞悬液的体积	血细胞计数板或电子计数器计数的细胞数	稀释倍数或抽样分数[a]	培养瓶中细胞浓度/（个/mL）	存活率（未染色细胞数/细胞总数）	活力染色的稀释因子	活细胞数/（mL）	细胞数/培养瓶
	V	C	D	$C\times D$	R	F	$C\times D\times R\times F$	$C\times D\times X\times F\times V$
未做活力染色的细胞数	20	15 321	100	1 532 100	1	1	1 532 100	30 642 000
做活力染色后用血细胞计数板计数结果	20	76	10 000	760 000	0.85	2	1 292 000	25 840 000

a 采用电子计数器时，0.4mL 细胞悬液用 20mL 计数溶液稀释，即稀释 50 倍，再乘以 2 作为稀释 0.5mL 悬液样品的计数结果，也就是说读数要乘以 100 作为计数结果。采用血细胞计数板时，如果计数 1mm×1mm 小室中的细胞，则要乘以 1×10^4；如果计数了所有 9 个 1mm×1mm 小室中的细胞（因为细胞很少），那就需要乘以 $1\times10^4/9$。在实际操作中，最好计数载玻片每个边的 1mm×1mm 小室中 5 个大格，这样就需要乘以 $1\times10^4/10$，即 1×10^3

表 27.5　练习 12 的分析

样品	每个培养瓶接种时细胞数	下一次传代时每个培养瓶细胞数	产率＝收获细胞数/接种细胞数
	N	$C\times D\times V\times R\times F$	$C\times D\times V\times R\times F\div N$
举例	200 000	30 642 000	153.21
指数期细胞			
平台期细胞			

练习 13 单层生长细胞系的传代

目的

通过转移细胞到新的培养器皿中来扩增细胞。可以稀释并再次接种到同样大小的培养器皿，或如果需要扩大培养，就换大容器培养器皿。

应用

常规贴壁细胞系传代，如 A549 或 HeLa 细胞；扩大培养以增加细胞产量和产物收获；为了实验目的而设置多份相同培养物；扩大储存用于低温保存。

训练目标

（1）*培养物的评估*：这个练习需要实习生检查并评估培养物的状态。实习生需要注意一般的外观、细胞形态、培养条件、无污染、培养基的 pH、细胞的密度。

（2）*无菌操作*：巩固练习 1、练习 8、练习 9 中学到的技巧。

（3）*次代培养或传代*：这个练习介绍了将培养物正确稀释后从一个培养瓶转移到另一个培养瓶来保证生长速率的原理。告诉实习生如何用胰蛋白酶来消化细胞，如何计数细胞并评价细胞的活力。实习生还需要确定细胞浓度，选择正确的接种浓度，逐渐培养起细胞培养中定量的概念，增强细胞计数能力。

（4）*生长特征*：熟悉有限细胞系与连续细胞系在外观及细胞繁殖的差别。

监督：如果实习生已经具备一定无菌技术，胰蛋白酶处理后，可以不必连续监督，但是教师要在旁边作间歇监督并回答问题。

背景信息


彩版 4

传代，传代标准（参见 12.5.1 节，图 12.2~图 12.4，彩版 4 和彩版 5）；变质和污染（图 12.1 和图 14.2）；细胞计数（参见 23.1 节）；生长周期和分裂率（参见 12.5.3 节），传代中的细胞浓度（参见 12.5.3 节，图 12.4）；选择培养容器（参见 7.3 节）；CO_2 和碳酸氢盐（参见 8.2.2 节，表 8.1）；培养细胞来源（参见 2.7 节）；无限增殖（参见 22.3 节和短篇综述 22.1）；细胞繁殖的密度限制（参见 22.4.2 节）；交叉感染（参见 13.1.1 节，表 12.2，ICLAC 数据库）。**标准方案**：单层细胞的传代（参见方案 12.3）。**补充方案**：倒置显微镜的使用（参见方案 18.1）；细胞计数（参见方案 23.1 和方案 23.2）；培养基的配制（参见方案 10.7~方案 10.9）；Giemsa 染色（参见方案 18.2）。


彩版 5

材料和操作示范：给实习生展示不同类型的培养器皿（表 7.2，图 7.3~图 7.8）和各种细胞照片，包括健康的（图 18.2；彩版 4，彩版 8，彩版 9）、不健康的（图 12.1）、有污染的（图 14.2a~c）及不同密度的（图 18.2；彩版 4，彩版 8，彩版 9）。要指导学生在相差显微镜下检查细胞，要示范用胰蛋白酶消化细胞（方案 12.3）。


彩版 8


彩版 9

练习 13 说明

概要

去掉培养基并淋洗单层细胞，加入胰蛋白酶短暂作用于细胞，然后去掉胰蛋白酶。孵育细胞，用培养基将细胞分散，计数，稀释并接种传代。

材料

无菌

- A549 或 HeLa 连续培养细胞系，以 2×10^4 个/mL 浓度接种至 25cm^2 培养瓶中，培养 7 天和 14 天，25cm^2

培养瓶，1个

- WI-38、MRC-5或相当于正常二倍体成纤维细胞的培养物，以 2×10^4 个/mL浓度接种至 $25cm^2$ 培养瓶中，培养7天和14天，$25cm^2$ 培养瓶，1个
- 生长培养基，为每个细胞系准备的培养基，预先标记细胞系名
- 含有Eagle's盐和23mmol/L HCO_3 的Eagle's 1×MEM，不含抗生素，2×100mL
- 以D-PBSA配制的0.25%胰蛋白酶，10mL
- 含有1mol/L EDTA的D-PBSA，20mL
- 移液管，有刻度的和棉塞的。如果是玻璃的，按不同大小分别装在方形罐中，1mL、5mL、10mL、25mL；如果是塑料的、单独包装的，按大小分类放在架子上
- 如果使用泵或真空系统，用未加棉塞的移液管吸取培养基
- 通用容器或50mL离心管，4个
- $25cm^2$ 培养瓶，8个

非无菌

- 移液管控制器或吸球
- 接通与真空管或蠕动泵相连的接收器
- 70%乙醇，装入喷雾瓶中
- 不含棉绒的棉塞或拭纸
- 吸水纸
- 装有水和消毒剂的移液管收集筒
- 血细胞计数板和电子细胞计数器
- 乙醇不溶性墨水标记笔
- 笔记本，笔，实验记录

操作步骤

1. 准备好BSC，将试剂和材料放入BSC，准备实验。

2. 仔细检查培养物，注意有无变质和污染迹象，估计细胞密度。

3. 将成纤维细胞瓶拿到无菌工作区，将连续细胞系放回孵箱。每个细胞系此时分别操作，对每个细胞系要重复此步骤。

4. 吸去培养基。

5. 向培养瓶中没有细胞的一侧加入D-PBSA/EDTA（$0.2mL/cm^2$），这样可以避免冲走细胞，使淋洗液覆盖细胞，弃去淋洗液。

6. 向培养瓶中没有细胞的一侧加入胰蛋白酶（$0.1mL/cm^2$），将培养瓶翻过来放置，确定单层细胞被完全覆盖，将培养瓶静置15~30s。

7. 将单层细胞上的胰蛋白酶去掉，淋洗培养瓶并快速检查确定细胞没有游离，如果存在问题，使用4℃胰蛋白酶防止过早分离。

8. 吸去胰蛋白酶，但要保留数滴。

9. 将培养瓶放平孵育，直到细胞变圆隆起（在显微镜下检查）；当培养瓶倾斜时，单层细胞应沿着表面下滑（这一步通常需要5~15min）。除非必要，不然不要将培养瓶放置太长时间，但另外一方面，在细胞消化还不够时也不要强行分散细胞，这样做可能导致细胞聚集。

10. 加培养基（$0.1\sim0.2mL/cm^2$），用吸管反复吹打培养瓶表面（有单细胞层）分散细胞。

11. 用吸管充分吹打细胞使其分散成单细胞悬液。
12. 用血细胞计数板或电子细胞计数器计数细胞，并记录细胞数。
13. 用25mL培养基稀释细胞悬液浓度达到2×10^4个/mL。
14. 吸取5mL细胞悬液分别接种到4个培养瓶。
15. 用可通气瓶盖盖上培养瓶，将它们放回温箱中。
16. 对于连续细胞系，从步骤3开始重复这一过程。
17. 7天后，每一个细胞系取两瓶，计数细胞。
    (a) 吸出培养基并丢弃。
    (b) 用2mL D-PBSA轻轻冲洗细胞，全部吸出丢弃。
    (c) 每个培养瓶加1mL胰蛋白酶。
    (d) 孵育10min。
    (e) 再加入1mL培养基，用吸管大力吹打分散细胞制成单细胞悬液。
    (f) 用血细胞计数板或电子计数器计数细胞。
18. 计算每个培养瓶中细胞数（个/mL培养基），以及胰蛋白酶消化时的细胞密度（个/cm^2）。
19. 将其他培养瓶中的细胞固定染色。

数据

（1）每个细胞系开始的细胞数，一周后两个培养瓶的细胞数（表27.6）。
（2）检查练习14中的细胞和染色后拍照。

分析

（1）计算增殖倍率：
收获的细胞数÷接种细胞数（表27.7）并解释两种细胞系的区别。
（2）这些细胞需要中间换液吗？
（3）评论两个细胞系之间细胞形态的差异。
（4）为什么在连续细胞系培养前处理成纤维细胞系，而不是同时或之后处理？

表27.6 练习13的记录

样品	胰蛋白酶的体积	血细胞计数板或电子计数器进行细胞计数	稀释倍数或抽样分数	细胞数/消化液	细胞数/培养瓶
	T	C	D	$C\times D$	$C\times D\times T$

表27.7 练习13的分析

样品	每个培养瓶接种细胞数	每个培养瓶收获细胞数[a]	产率＝收获细胞数/接种细胞数
	N	$C\times D\times T$	$C\times D\times T\div N$

a 在这个例子中，至少在消化前的预洗，未考虑消化中的细胞活性，为的是在操作连续细胞系时更多地去除不能存活的细胞。虽在早期传代或原代培养时需要考虑生存力，但本练习可不必考虑（参见练习19记录）

练习 14 单层培养细胞的 Giemsa 染色

目的

固定细胞进行多重色染色（如 Giemsa 染色）可以显示细胞的形态特征和状态及细胞的起源。

应用

常规条件和实验条件下的细胞形态监测，通常要联合使用相差显微镜；对细胞外观进行永久记录，提供参照；鉴定原代培养细胞的类型；交叉污染的早期鉴别。

训练目标

强调细胞培养过程中观察细胞的重要性，增强重视细胞形态的意识。

监督：不是最严。

时间：30min。

背景信息

形态学（参见 18.4 节）；染色（参见 18.4.2 节）。

标准方案：Giemsa 染色（参见方案 18.2）。**辅助方案**：结晶紫染色（参见方案 18.3）；使用倒置显微镜（参见方案 18.1）；显微镜上的数码照相（参见方案 18.5）。

示教材料和操作：演示准备染色液和染色的步骤，演示以前已染的样本。

▲**安全提示** 对于人源细胞要和以前练习中一样保持警惕，直至细胞已经固定。甲醇有毒且可燃。

练习 14 说明

概要

甲醇固定培养细胞，直接用未稀释的 Giemsa 染液染色，再以 1∶5 稀释染液。洗培养细胞，并在湿润下检查。

材料

无菌

- D-PBSA
- D-PBSA 和甲醇 1∶1 混合
- 甲醇
- 未稀释的 Giemsa 染液
- 去离子水

操作步骤

1. 这一步适用于单层细胞，也可使用固定的悬浮细胞（见 18.4.4 节），直接从步骤 6 开始。
2. 吸去培养液。
3. 用 D-PBSA 漂洗单层细胞，弃去。

4. 每个25cm^{2}培养瓶加入5mL D-PBSA/甲醇混合液，静置2min，弃去D-PBSA/甲醇混合液。

5. 加入5mL新鲜的甲醇，静置10min。

6. 弃掉上一步中的甲醇，用新鲜的无水甲醇代替。漂洗单层细胞，弃去甲醇。

7. 培养皿干燥后直接染色或储存备用。

8. 每个25cm^{2}培养瓶加入2mL干净的Giemsa染液，摇晃培养瓶，确保整个单层细胞都被染液覆盖。

9. 2min之后，用8mL的水稀释染液，轻轻晃动2min。

10. 将染液换成水，形成的泡沫浮起，没有遗留在细胞表面。用流动的自来水轻轻冲洗直至将所有的粉色云点背景（沉淀）去掉，但要保证细胞中的染液没有浸出（通常10~20s）。

11. 将水倒净，用去离子水漂洗单层细胞，在细胞未干之前用显微镜观察。将细胞干燥储存，重检时重新湿润。

分析

（1）使用练习13中的培养皿，比较两种细胞系的形态。

（2）分别在移去培养基、固定之前（使用相差照明）和染色后（使用普通亮视野照明）照相。

练习15 生长曲线的制作和分析

目的

熟悉传代后细胞再生长模式，证实常规传代后细胞的生长周期并作为分析工具。

应用

生长曲线；细胞增殖分析；细胞毒性分析；生长刺激分析；培养基和血清检测。

训练目标

重复实验的设置；细胞计数和生存力；绘制并分析生长曲线；了解倍增时间和饱和密度的差别；选择再接种密度。

监督：如果练习11的进展令人满意，则消化和计数过程不需要监督，但是在铺细胞时需要一些监督。需要强调的是，混杂的培养皿中的样品绝不用于常规传代培养，因为有交叉污染的风险。

选择：本练习有两个选择，①在培养瓶中常规培养一种细胞系，测试简单的生长曲线；②用多孔板分析两种不同细胞系在不同生长密度时的生长差别，或在不同实验条件下的生长差别。对培养瓶而言，一个培养瓶只能接种一种浓度的细胞系。培养瓶对于染色实验来说，面积太大，不适用于培训。对于多孔培养板来说，每天收集一板的细胞，可以同时处理两个参数（如接种浓度和细胞类型），训练者同时拿取两种细胞时要引起注意，无论是培养瓶还是实验培养板都不再进行后面的繁殖。这项实验使用的培养基中含有低剂量碳酸氢盐，应使用密封培养瓶在常规空气条件下培养。

时间：第0天1h，此后每天30min直到第10天。

背景信息

培养器皿的选择（参见7.3节）；培养基和气相的选择（参见8.2.2节）；重复取样（参见23.8节）；生长周期（参见23.9.2节）；生长曲线，单层细胞的生长曲线（参见方案23.7，用于确认在培养瓶中培养细胞的常规培养条件，或见方案23.8，即以多孔培养板分析不同浓度的细胞生长状态或比较两种不同细胞系的生长）；微量滴定分析（参见24.3.5节）。

标准方案：拿放培养皿或培养板（参见方案5.3），用培养瓶测试生长曲线（参见方案23.7），用多孔培养板测试生长曲线（参见方案23.8）。**辅助方案**：悬浮细胞的生长曲线（参见方案23.9）；基于MTT的细胞毒性

分析（参见方案24.4）。

示教材料和操作：给实习生讲解各种多孔培养板（表7.2，图7.3）和它们的应用。示范打开的培养板的使用及如何避免污染（参见5.4.2节）。

▲安全提示 操作人源细胞时需要小心（参见6.8节），操作打开的培养板或培养皿时需要特别小心，因为增加了溢出的危险性（参见5.5.2节和图5.11）。

练习15说明

A．在培养瓶中进行一种细胞类型和一种细胞浓度的培养

概要

配备24个培养瓶，10天内每天收集两个培养瓶的细胞并计数。对剩下的细胞进行固定和染色。

材料

消毒和无菌制备

- 单层细胞培养，A549或HeLa细胞，75cm^{2}培养瓶，对数生长晚期，1份
- 0.25%粗制胰蛋白酶，含10mmol/L EDTA，10mL
- 含4mmol/L $NaHCO_3$的生长培养基，200mL
- D-PBSA（用于细胞漂洗和细胞计数），500mL
- 25cm^{2}培养瓶，24个

操作步骤

1．用胰蛋白酶消化进行常规传代。
2．稀释细胞悬液至2×10^4个/mL，共150mL培养基。
3．接种至25cm^{2}培养瓶中，共24瓶。
4．盖好培养瓶，放至37℃培养箱中。
5．24h后，从培养箱中取出前两个培养瓶进行细胞计数。

注意事项 如果用血细胞计数板进行计数，对于低浓度细胞而言，生长曲线的开始阶段将难以计数。将胰蛋白酶的体积降至0.5mL，小心分散细胞，使用移液器时小心产生泡沫，将细胞转移到血细胞计数板上。在统计每个培养瓶细胞个数时要记住使用了不同的胰蛋白酶量。

6．48h和72h重复取样。
7．根据pH下降所示，72h或略早一点换液。
8．对于快速生长的细胞（即PDT为12~24h），每天取样；对于慢速生长的细胞（即PDT＞24h）可以减少取样频率，每2天一次，直到平台期。
9．每3天换一次液，如果pH下降，可以提高换液频率。
10．在第2、5、7、10天分别取一瓶细胞进行染色。

B．多孔培养板中两种细胞系的3种浓度的培养

概要

设立两种细胞系的3种浓度的培养（图27.1），每天收集一个板中的细胞，并进行计数。未密封的培养

板需要高浓度的碳酸氢盐和潮湿的 CO_2 培养箱（参见 8.2.2 节）。

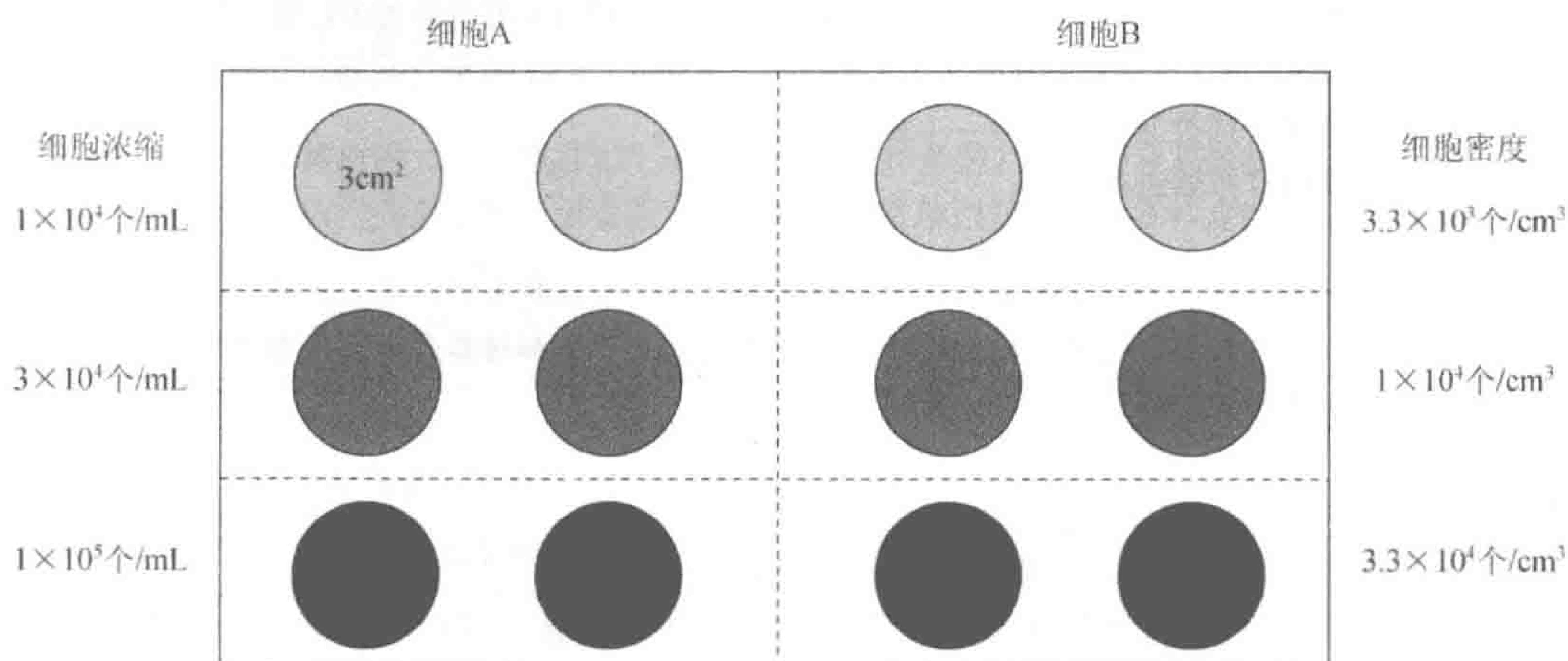


图 27.1　12 孔板布局。每个板使用 3 个浓度的细胞悬液和两种不同类型的细胞，需要增加相同设置的多孔板用于每天重复取样。注意：这些培养的细胞仅仅用于取样，除非在一次实验中，否则不能用于传代培养，然后丢弃这些有交叉感染高风险的混合培养板

材料

消毒或无菌制备

- 单层细胞培养，A549 和 MRC-5，75cm² 培养瓶，对数生长晚期，每种一瓶
- 0.25%粗制胰蛋白酶，含 10mmol/L EDTA，10mL
- 生长培养基，含 Earle's 盐和 26mmol/L $NaHCO_3$ 的 MEM，200mL
- D-PBSA（预洗细胞和细胞计数用），1500 mL
- 12 孔培养板，12 个

无菌

- 装培养板的塑料盒子
- CO_2 培养箱或通入了 5% CO_2 气体的净化盒子

操作步骤

1. 分别用胰蛋白酶消化培养瓶中的细胞，进行常规传代培养。
2. 将细胞悬液稀释至 1×10^5 个/mL、3×10^4 个/mL 和 1×10^4 个/mL，每个浓度用 25mL 培养基。
3. 12 个 12 孔板中每个孔接种 1mL 培养基。左手边的两个孔用于接种各个浓度的 MRC-5 细胞，右手边的两个孔接种 A549 细胞。将 1×10^4 个/mL 浓度的细胞悬液接种至第一排培养孔中，将 3×10^4 个/mL 浓度的细胞接种至第二排培养孔中，将 1×10^5 个/mL 浓度的细胞接种至第三排培养孔中（图 27.1，见图 23.9 其他的设计选择）。
4. 将培养板放置在潮湿的 CO_2 温箱中，或是通入 5% CO_2 的密闭盒子中。
5. 24h 后，从温箱中取出第一个培养板，选每种细胞类型的每个浓度的一个孔进行拍照。
6. 用胰蛋白酶消化孔中的细胞，计数。
7. 将孔中的培养基全部移去。
8. 每个孔中加入 0.5mL 胰蛋白酶/EDTA，保证所有细胞都被液体覆盖。

9．将培养板孵育15min。

10．加入0.5mL含血清的培养基，将细胞分散至含胰蛋白酶/EDTA的培养基中，将上述0.4mL细胞悬液转至19.6mL的D-PBSA中（这项实验需要1个Coulter Z 系列或CASY细胞计数器，其他的稀释浓度或未稀释的样品可能需要使用不同类型的计数器——查看产品说明）。

11．利用电子细胞计数器进行计数。

注意事项 也可以用血细胞计数板进行细胞计数，但对低浓度细胞而言，用血细胞计数板可能有一定的难度。如果是用血细胞计数板，请将胰蛋白酶的体积减至0.1mL（不加培养基），用移液器时避免起泡，并轻轻将细胞分散，再将细胞转移到血细胞计数板上进行计数。

12．按着步骤5和步骤6于48h和72h重复取样。

13．72h时换液，如果pH发生改变可以换的早一些。

14．继续对快速生长的细胞进行每天取样（即PDT 12~24h的细胞），慢速生长的细胞降低取样频率为每2天一次（PDT＞24h的细胞），共连续10天。

15．只要是pH降低，每1、2或3天换液。

注意事项 本练习中将两种细胞系同时进行处理，由这些细胞分裂而来的子代细胞必须丢掉，不能繁殖用于以后的使用。

数据

每天对每个孔或每个培养瓶中的细胞进行计数。

分析

（1）计算培养过程中，培养瓶或培养板中每毫升培养基和每平方厘米面积中的细胞的个数。

（2）用每天细胞数量的对数平均值对应接种的天数进行线性绘图（参见23.9.2）。

（3）获得对数生长时间、倍增时间和饱和密度。

（4）哪种细胞浓度最适合于进行常规的传代培养？

（5）解释正常细胞和转化细胞之间的区别。

（6）为什么培养板中的细胞密度整体都比较高？

（7）哪种培养器皿最适合于进行常规的传代培养？

27.4 高阶练习

这些练习需要实习生或学生先在基础练习中取得令人满意的进步，否则不宜进行。尽管是高阶练习，仍然是常规应用，对于要掌握细胞培养专门技术的人都是必要的。如果有时间限制，而且实验室的其他人已经完成这些练习，那么实习生或学生可以不要求完成这些练习。然而需要认识到，如果是这样，这样的训练不能认为是全面的，除非完成这些高阶练习。

迄今已经提供了一些基础知识，所以不会像基础练习那样给出标准方案的变化细节，因为高阶的实验设计仍属于培训目标的有益和重要的一部分。基础练习是按照应该完成的顺序来编排的，而高阶练习不必按特定顺序安排，对于一组学生，可以通过轮换来完成。

练习 16 细胞系鉴定

细胞系鉴定与支原体检测（参见练习 17）是细胞培养工作者需要掌握的最重要技能之一。在细胞系特征的鉴定应用中有些鉴定方法是基本的，而实验室可以根据日常使用需要，选择特定的方法。如果实验室可以提供 DNA 指纹图谱，那么这个简单的指标对于鉴定单个人类细胞系就足够了，当然前提是可以提供这个细胞系以前的可比较数据［ASNI/ATCC ASN-0002-2011］，否则的话就需要两种及以上技术来鉴定。动物细胞系需要选择鉴定方法（见 13.1.6 节）。日常使用的细胞系也许已经有了与这株细胞系使用相关的鉴定特征，如特定受体的表达、特定产物的表达，或对某种药物有抗性，那么它也许只需要加一个其他指标，如 SRT DNA 指纹分析、染色体或同工酶分析。如果没有 DNA 指纹技术或分析，没有人会愿意为了培训练习而建立这样一套系统，那么只能把细胞送到商业实验室分析，这样更有优势，因为商业实验室有更多参考样品可用于比较。尽管如此，在培训计划中加入这个练习以便给学生或实习生留下细胞系鉴定重要性的印象是非常明智的，还有错误识别细胞系的广泛使用和可能后果（参见 13.1 节，表 13.1，ICLAC 数据库）。

同工酶电泳，可以用商品化试剂盒简单而便宜的完成，推荐作为这个练习的一个简单操作实验。但是，必须让学生了解非人类细胞系的鉴定，目前的趋势是 DNA 编码（参见第 13.1.6 节）。

目的

确认一个细胞系的身份。

应用

检查偶然的交叉污染；细胞系冻存前和（或）开始一个计划或项目前的质量控制；引入细胞系的确认鉴定。

训练目标

使实习生认识到需要对细胞系进行鉴定。加强对过度生长、错误鉴定和交叉污染的了解。

监督：样品的制备和电泳需要监督，尽管可能不必连续。

时间：2h。

背景信息

身份认证（参见 13.1 节）及特征鉴定（参见 18.1 节）的需要；形态学（参见 18.4 节）；同工酶（参见 13.1.7 节）；染色体组成（参见 13.1.8 节）；DNA 指纹技术（参见 13.1.5 节；短篇综述 13.1）；抗原标记（参见 18.5 节）。**标准方案：**同工酶分析（参见方案 13.3）；**辅助方案：**染色体制备（参见方案 13.4）；DNA 指纹（参见方案 13.1）；直接免疫荧光（参见方案 18.6）。

示范材料或操作：Authentikit 电泳设备的使用（参见图 13.5）；DNA 样品的指纹图谱（参见图 13.2）；染色体核型的样品（参见图 13.6~图 13.8）。

▲**安全提示** 不同于前面操作人源细胞系，这个练习中没有特别的安全要求。

练习 16 说明

概要

制备细胞抽提物，在琼脂糖凝胶上电泳，然后用显色底物看结果。

操作步骤

使用标准方案：同工酶分析（参见方案13.3）。

实验变通

选择6个细胞系进行检测，可在实验室提供的细胞中选择，或者从下述细胞中选择：HeLa；KB或Hep-2；Vero；L929；3T3或3T6；BHK-21-C13；CHO-K1。来自不同种属的大多数细胞系可以通过4个同工酶来区分：核苷磷酸化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、苹果酸脱氢酶和乳酸脱氢酶，但添加天冬氨酸转氨酶、6-磷酸甘露糖异构酶和蛋白酶B将进一步增加分辨率。

数据

一旦凝胶用合适的发光底物染色就可以照相和扫描。凝胶可以保存起来。

分析

（1）比较不同细胞系的每一种酶的差别。

（2）是否见到细胞间交叉污染或错误识别的证据？

（3）如何提高不同细胞系间的分辨率？

练习17　支原体检测

目的

证明细胞系没有支原体污染。

应用

常规细胞系维持；细胞冻存前的质量控制；检查引入的细胞系、组织和检疫时的活组织。

训练目标

了解支原体检查的重要性。熟悉利用荧光或PCR方法常规检测细胞系有无支原体污染。

监督：培养和传染饲养层细胞不必监督，倘若存在真实的支原体污染，那么操作步骤需要在严格监督下进行检疫监控。支原体染色、DNA提取和PCR等要根据实习生对这些方面的经验来进行间歇监督。解释结果时需要连续监督。

时间：检测开始前5天每天30min用于培养或接种细胞；第0天1h用于准备培养物；第1天30min用于更换检测细胞的培养基；第5天2~4h用于培养物的染色或PCR；剩下的30min用于检测结果。

背景信息

支原体（参见14.3.2节）；确认（参见6.10.3节）。**标准方案**：支原体的荧光检测（参见方案14.1）或通过PCR确定支原体污染（参见方案14.2）。**辅助方案**：数码照相（参见方案18.5）。

示范材料和操作：检疫步骤（参见14.1.8节）；荧光显微镜或PCR仪的使用；提供固定过的支原体阳性培养物。

▲**安全提示** 除了对于人源细胞的标准防范之外没有其他特别的要求（参见6.8.3节）。甲醇有毒、易燃，实习生需要了解在无保护情况下暴露在紫外线下及移动荧光显微镜工作光源的严重风险。

练习17说明

概要

待检测培养物在无抗生素条件下培养5天，取培养基样品加入一个指示细胞系中，已知该细胞系支持支原体生长，通过荧光DNA染色或PCR方法分析指示细胞。

操作步骤

用标准方案：支原体的荧光检测（参见方案14.1），或用PCR方法确定支原体污染（参见方案14.2）。

实验变通

除了探寻污染培养物的潜在线索，这个练习中很难再加入其他实验元素。不是所有的实验室都愿意进行这样相当危险的实验，除非有特别的设备可供使用。

数据

（1）参照已有的固定过的阳性对照标本［（荧光）或支原体DNA（PCR）］，判断阳性或阴性。
（2）所有的实验和结果都需记录在书面的工作日志中，或更新细胞系数据库。

分析

（1）支原体阳性标本会在细胞质中显示出针尖状或纤丝状荧光染色（彩版16e、f）。
（2）比较PCR产物DNA与对照的电泳迁移图谱（图14.3）。


彩版16

练习18 培养细胞的冻存

目的

提供一个安全的细胞储存，避免污染、设备故障或技术性错误造成的意外丢失或遗传、表型的不稳定。

应用

保护新建和已建系的细胞系；细胞库的细胞保存和提供；细胞库为一个计划或项目的整个过程提供细胞；经照射或丝裂霉素C处理的饲养层细胞的储存。

训练目标

熟悉细胞的冷冻和解冻过程；指出可能的变化来改善不同细胞系的冻存程序；比较细胞的实际存活或染色排斥判断细胞活力。

监督：基本步骤可以不必监督，例如，消化、计数、加保护剂、装入冷冻管等，但是液氮罐控制系统的操作、冷冻管的冷冻和转移、复苏和解冻需要监督。

时间：第1天1h；第2天15min；第3天30min；第4天1h。

背景信息

冻存的基本原理（参见15.1节）；冷冻率（见15.3.4节）、冷冻冰箱和冷冻柜记录（参见15.3.6节）；

遗传不稳定性（参见18.1节、22.2节）；细胞系的演化（参见2.7.2节）；衰老的控制（参见22.3.1节，短篇综述22.1）；连续置换（参见15.4.2节）；细胞库（参见15.5节）；冻存剂（参见15.3.3节）；**标准方案**：冻存和解冻细胞（参见方案15.1，方案15.2）。**辅助方案**：冻存管（参见15.3.10节）；单层细胞的传代（参见方案12.3）；悬浮细胞的传代（参见方案12.5）；血细胞计数板进行细胞计数（参见方案23.1）；电子细胞计数仪（参见方案23.2）；染料排除估计细胞的活力（参见方案24.1）。


彩版22

示范材料或操作：给实习生展示常用冷冻管的种类（参见彩版22e）、冷冻设备（图15.2~图15.4）和冷冻设备的类型（参见15.5节、15.6节），介绍冷冻之前所需的条件（表15.1）；介绍冷冻调查控制系统使用和维护、细胞系的记录（参见15.4.1节），以及细胞培养的系列置换（参见15.4.2节）。告知实习生监测液氮水平和冻存温度的重要性，以及补充液氮的规章制度。

▲**安全提示** 像前面介绍的那样小心操作人源细胞系（参见6.8.3节）。此外要防止冻伤、窒息，以及冷冻管浸入液氮时可能爆炸（参见6.5.6节）。需要极力推荐的是，针对这个实验的目的和为了防止爆炸，冷冻管不要浸入液氮，而是储存在气相或有灌注壁的冷冻器（等温槽）内。

练习18说明

概要

高浓度的细胞在含有保护剂（甘油或DMSO）的培养基中慢慢冷却（事先预冷或不预冷），慢慢冷冻，再放到液氮罐中（图27.2）。复苏时要迅速溶解，慢慢稀释，然后再以高密度进行接种（图15.8）。

材料

冻存

消毒或无菌制备

- 要冻存的细胞，刚刚汇合，75cm^{2}培养瓶，2个
- GM50：含50% FBS的生长培养基，100mL
- D-PBSA（漂洗和计数用），50mL
- 0.25%粗制胰蛋白酶，10 mL
- 含DMSO的冷冻用培养基（DFM）：含20% DMSO的GM50，10mL
- 含甘油的冷冻用培养基（GFM）：含20%甘油的GM50，10mL
- 1.2mL塑料冷冻管，12支

非无菌

- 血细胞计数板或电子细胞计数仪，1个
- 可放置6个1.2mL塑料冷冻管的半环形长条（由液氮罐供应商提供），2个
- 放半环形长条的隔热管，2支
- 隔热管中用的棉花或泡沫塑料堵塞物，4个
- 支撑长条的厚纸管（由液氮罐供应商提供），2支
- 或可替代前4项的物品：
- 冷冻箱（CoolCell，Biocision；Numc Mr Frosty，Thermo Scientific）或一个可编程的冷冻室（Kroyo560，Planar等）。
- 腈制保护手套（拿放DMSO）和冷冻保护剂（拿放冻存物）

- 冰浴槽

解冻

无菌

- 含10% FBS的标准生长培养基，200mL
- 25cm^{2}培养瓶，12个
- 1mL和10mL的移液管，各20个
- 2mL注射器和19G针头（如果使用玻璃冷冻管），1个

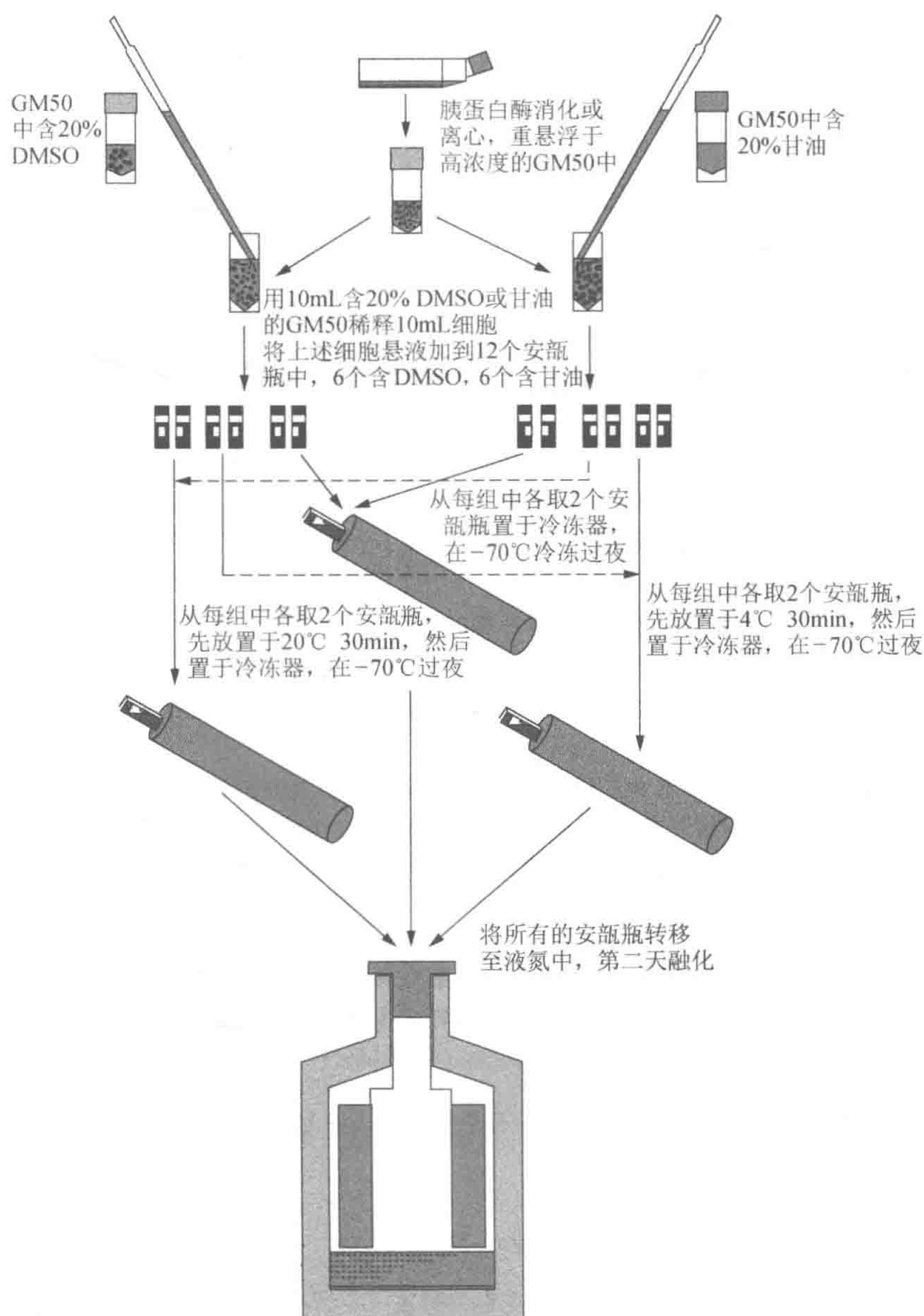


图27.2 细胞冷冻实验的选择。本图列出了实验的变化，可作为练习18的补充，也可以将它们合成为一个实验，但如果作为学生的练习，最好还是每天或每个组做一个实验。冷冻箱可选择实验室常用者

非无菌

- 0.4%锥虫蓝，10mL
- 70%乙醇，200mL
- 带有支架的37℃水浴锅，灭菌水，保证冷冻管的盖子不被水浸没（参见图15.8左）

▲安全提示 为防止冷冻管在解冻的过程中爆炸，储存过程中，冷冻管不能浸入液氮中。冷冻管一旦浸入液氮中，需将其取出放到有盖子的容器中进行解冻（图15.8右）。

- 移液器，50μL
- 保护性手套和面具
- 镊子
- 拭子

操作步骤

A．冻存细胞

1．肉眼和显微镜观察细胞，确保满足细胞冻存的条件。

2．胰蛋白酶消化，重悬于GM50中，细胞计数。如果使用细胞悬液的话，离心计数细胞。

3．稀释细胞悬液至1×10^7个/mL。

4．将细胞悬液分成两份，各10mL。

5．用DFM或GFM按1∶1稀释细胞，至每毫升5×10^6个，含有10% DMSO或甘油。

6．标记6个冷冻管用于装DFM稀释的细胞，同时标记6个冷冻管用于装GFM稀释的细胞，6个中每两个一组分别标上A、B、C。

7．将细胞分装到预标记的冷冻管中，盖上冷冻管的盖子。

8．将标记A的4个冷冻管放在冰上，标记B的4个冷冻管放在37℃，标记C的4个冷冻管放在室温。

9．30min后，将12个冷冻管卡入2个长条内，插到硬纸管中，立即放至隔热管中。

10．将隔热管放至–70℃过夜。

11．在将冷冻管从–70℃冰箱移出来之前，检查冰箱的记录，并为冷冻管找好适当的位置。

12．从隔热管中将放着冷冻管长条的硬纸管取出，将硬纸管中的冷冻管移到液氮罐中的气相，放到预先确定的筒中。此转移过程必须要快（<2min），因为冷冻管的温度每分钟将上升10℃，并且如果温度上升到–50℃以上，细胞活性会受到影响。

▲安全提示 当把冷冻管放到液氮罐中的时候，一定要戴保护性的手套和面具。不要将冷冻管浸没到液氮中，因为这样的话，冷冻管中会进入一部分液氮，在解冻时会爆炸。浸没冷冻管也有细胞被污染的高度危险性。

13．将冷冻管安全地放至液氮罐中后，做好冻存条件记录（表15.2，表15.3）。

B．解冻冻存细胞

1．检查需要解冻的冷冻管的放置地点。

2．收集所有必备用品，准备培养基，培养瓶上贴好标签。

3．将冷冻管从液氮罐中取出，检查标签，将其放到37℃水浴锅中的支架上，避免水接触到瓶盖，否则会增加污染的概率。虽然它们加热会慢一些。

▲**安全提示** 当从液氮罐中取出冷冻管时，一定要穿实验室隔离衣，戴面具、保护性的手套。冷冻管，包括塑料的冷冻管，一定要存放在气相中，如果是在液相中会吸进液氮，解冻时，则会发生剧烈爆炸。如果冷冻管已经浸没到液氮中，请求老师指导，在带盖子的塑料桶中解冻，防止爆炸（图 15.8）。

4．当冷冻管解冻后，再次检查冷冻管上的标签，确保细胞是正确的，用 70%乙醇擦拭冷冻管，在层流超净台中一次一个地打开。

5．用 1mL 的移液器将冷冻管中的液体分移到已标记的培养瓶中。

6．向细胞悬液中缓慢加入培养基：2min 加入 10mL，一开始逐滴加入，随后可加快速度，逐渐稀释细胞和冷冻保护剂。

7．盖上气体可通透的盖子，放到 CO_2 培养箱中。

8．在冷冻管剩液中加一滴台盼蓝，确定细胞活力。

9．24h 后用胰蛋白酶消化，进行细胞计数（此步仅为练习，并不是常规细胞冻存过程中的标准步骤）。

10．细胞计数。

实验变通

一些其他的练习可以在此练习中进行，鼓励操作者自己设计步骤。

（1）改变冻存率。

（2）细胞冻存剂的浓度。

（3）解冻后离心去除细胞冻存保护剂。

（4）解冻后，通过离心将保护剂去除或第二天置换培养基。如果采取此步骤，可以比较悬浮生长细胞（如 L5178 淋巴瘤、杂交瘤细胞或 HL60）和单层贴壁细胞（如 HeLa、A549、Vero 或 NRK）的生长。

（5）解冻后快速或慢速稀释。

数据

（1）完成标准冻存的常规记录（表 15.2，表 15.3）。

（2）记录每个冷冻管剩液的细胞活率。

（3）记录解冻后第二天胰蛋白酶作用后的细胞个数（不是常规记录，仅为产生细胞生存数据）。

（4）将结果制成如练习 13 和练习 14 中的表格，解冻当天计算复苏的有活力的细胞，解冻后第二天计算贴壁细胞（仅为单层培养细胞）的个数。

分析

（1）哪种冻存剂最适用于你的细胞？

（2）染料排除测定的活力与复苏 24h 后是否一致？

（3）如果不一致，原因是什么？

（4）冻存前这段时间的温度对冷冻效果是有利还是有害？假设需要一段延迟时间才能转移到冷冻，这项练习的目的是确定在延迟阶段是否需要控制温度。然而，如果能直接转移，转移过程不延迟，就需要严格地控制。有一个冷冻装置（Nune Mr.Frosty；Thermo Sciencific；CoolCell；Biocision）或一个可编程的冷冻室（如 Kryo 560，Planar）可能容易做到。

（5）加入保护剂后冷却细胞是否效果更好？

练习 19 原代培养

目的

从活体组织中分离细胞进行培养。

应用

为生产疫苗进行原代培养；分离特殊的细胞类型以供研究；染色体分析；研发选择性培养基；为筛选和分析实验和组织工程提供短期细胞系。

训练目标

认识培养细胞的起源和多样性；了解有各种不同的原代培养方法。

监督：间歇性的。

时间：当天2~4h，第一天1h，第三天2h。

背景信息

选择鸡胚做这个练习有很多理由。鸡胚是小型动物，容易获得，如果小于孵化期的一半可以不受限制地进行解剖；它的孵化期是21天，所以10天的胚胎可能有一点小，但颇为合适。鸡胚比小鼠的同期胚胎要大一些，所以无论是剪碎整个胚胎还是分离某一器官都可以获得更多的细胞。

原代培养的类型（参见11.1节）；组织的分离（参见11.2节）；温胰蛋白酶消化（参见11.3.3节）；冷胰蛋白酶消化（参见11.3.4节）。**标准方案**：（参见方案11.2、方案11.4、方案11.6、方案11.7）。**补充方案**：小鼠胚胎（参见方案11.1），人类组织（参见方案11.3），胶原酶消化（参见方案11.9），机械分散（参见方案11.10），富集活细胞（参见方案11.11）。

材料或操作示范：鸡胚的解剖（或其他的组织来源），各解剖阶段的拍照（图11.4和图11.11）。

▲安全提示 如果使用鸡胚材料，安全要求很低。

练习19说明

概要

从鸡蛋取出胚胎并解剖，整个胚胎剪碎或分离单一器官后用温或冷的胰蛋白酶进行消化，而后进行外植块原代培养和解离细胞的原代培养。整个练习可用一个鸡胚，但从步骤D到步骤E使用另一个新鲜的鸡胚会更好。

材料

无菌

- DBSS：解剖BSS（解剖时使用；见附录Ⅰ），200mL
- D-PBSA（解离用培养基、用于稀释胰蛋白酶），1000mL
- 生长培养基（如含20%胎牛血清的50∶50 DMEM∶F12培养基），200mL
- 用D-PBSA配的胰蛋白酶，2.5%（用于温胰蛋白酶消化），100mL
- 用D-PBSA配的胰蛋白酶，0.25%（用于冷胰蛋白酶消化），100mL
- 小烧杯，20~50mL或鸡蛋杯
- 直镊和弯镊
- 手术刀，11#刀片
- 100mL烧杯（乙醇处理后冲洗器具），1个
- 9cm有盖培养皿（非组织培养级别，用于解剖），12个

- $25cm^2$ 培养瓶，24 个
- 250mL 胰蛋白酶消化培养瓶（锥形培养瓶或搅拌培养瓶），1 个
- 磁力搅拌子，于试管中高压灭菌，1 个
- 10~15mL 试管，最好是带螺口盖的玻璃管（用于盛器官原基），6 支
- 25~50mL 小的锥形培养瓶或普通的容器（用于冷胰蛋白酶消化），1 个
- 巴斯德移液管，30 支
- 10mL 宽头的移液管，10 支

非无菌

- 孵育 10 天的鸡胚种蛋（如果规定允许，最好是第 11 天）
- 70%乙醇（擦拭鸡蛋及工作台面）
- 0.4%台盼蓝
- 纯净的 Giemsa 染料
- 拭子
- 潮湿的孵箱（CO_2 浓度不超过大气水平）
- 可调 100μL 移液器
- 磁力搅拌器
- 血细胞计数板或细胞计数仪
- 冰浴锅
- 双目解剖显微镜

流程 A. 分离鸡胚

摘要：去掉鸡蛋的头壳部，将鸡胚轻轻取出放至 Petri 培养皿中。

1. 用 70%乙醇拭擦鸡蛋，将鸡蛋钝的一面朝上放至小烧杯中（图 11.4a）。
2. 将蛋壳的头部敲开（图 11.4b），用消毒镊子沿着气囊边缘剥去蛋壳（图 11.4c）。
3. 重新消毒镊子（即浸没到乙醇中或用消毒的 D-PBSA 清洗），然后用镊子剥掉白色的壳膜以暴露下层的绒膜尿囊膜（CAM）及血管（图 11.4d、e）。
4. 用消毒的镊子撕去 CAM（图 11.4f），轻轻握住鸡胚头的下部，将胚胎取出（图 11.4g、h）。镊子不要夹得太紧，否则颈部将会切断；将中指放到镊子下方，用指头肉垫阻止来自食指的压力（图 11.4g）。
5. 将鸡胚转移至内含 20mL DBSS 的 Petri 培养皿（图 11.4i）中。
6. 剪掉头部。

流程 B. 原代移植

摘要：将组织剪碎，洗净，将碎块接种到内含高浓度血清（即 40%~50%）培养基的培养瓶表面，因为表面张力，组织块能黏附于培养瓶表面（图 11.6a）。

1. 将头和身体转移到新鲜无菌的 DBSS 中。
2. 剥掉头部皮肤，用外科手术刀交叉切成约 1mm 大小的组织块（图 11.6a）上。
3. 用宽头枪头（为防止组织块粘连，事先用 BSS 湿润枪头）将组织块转移到培养瓶中，每个 $25cm^2$ 培养瓶 20~30 块。
4. 移去大部分液体，每 $25cm^2$ 生长表面加入 1mL 生长培养基。轻轻倾斜培养瓶，让组织块散开至整个生长表面。
5. 用可透气的盖子盖上培养瓶，放在 CO_2 温箱中 37℃培养 18~24h。

6. 第二天，检查生长情况，小心加入 1mL 培养基，不要让组织块漂起。

7. 在接下来的 3~5 天，逐渐使每个 $25cm^2$ 培养瓶内的培养基达到 5mL。

8. 每周更换培养基，直至观察到大量向外生长的细胞。

流程 C. 分离鸡胚器官原基小块

摘要：分离出器官或组织，整个放入冷胰蛋白酶中过夜。弃去胰蛋白酶，短时间内孵育器官或组织，将其分散在培养基中，稀释后进行培养。

1. 轻轻摘掉眼球，并将其打开，露出晶状体和房水及玻璃状液（图 11.11c、d）。

2. 用镊子夹住两对视网膜，将色素视网膜轻轻地从神经视网膜和结缔组织上剥离下来（图 11.11e）（10 天胚胎的剥离需要用解剖显微镜，如果将组织短时间浸泡在含 1mmol/L EDTA 的 0.25%胰蛋白酶中更容易分离）。将组织放至培养皿的一侧。

3. 用弯镊子去掉头的上部，将脑子取出（图 11.11f）。将脑子和视网膜放在培养皿的一侧。

4. 在有粉红色肝的腹壁处，将躯干横向地二等分（图 11.11g），如果切口在膈膜方向，切口将位于心脏和肝之间，有时肝的位置会颠倒。

5. 轻轻地深入切面的前部分，将心脏和肺取出（图 11.11h，挑出各器官，在确定之前不要剪断），将心脏和肺分开，放在培养皿的一侧。

6. 从后面探入，取出肝，由于肠夹于肝两叶之间，可一并取出（图 11.11i），将肠和肝分开，各置培养皿的一侧。

7. 将体壁折回，暴露体腔背侧面的内壁。可见腹中线两侧与其平行的瘦长分叶的肾。

8. 用手术刀刀尖在肾脏下部轻轻滑动，将肾脏从腹腔壁上分离下来（图 11.11j）（10 天胚胎的分离需用解剖显微镜）。轻轻将肾脏剪下来，放至一侧。

9. 将手术刀的尖部放在后背部末端的中线上，交替滑行前进，像挤牙膏一样将脊髓挤出（图 11.11k）（用 10 天的胚胎进行此步可能会有些困难）。

10. 将胚胎的后背躯干翻转过来，将后背及大腿的上半部分的皮肤剥脱下来（图 11.11l），将剥脱下来的皮肤放置一侧。

11. 将每条腿的肌肉剥下来，收集在一起（图 11.11m）。

12. 选择 6 块上述组织块，分别放至小试管中，弃去多余的 BSS，加入 1mL 冰上预冷的胰蛋白酶，将试管放在冰上。确保组织浸没在胰蛋白酶中。

13. 将试管放到 4℃中保存 6~18h。

14. 轻轻吸去管中的胰蛋白酶，不要吸到组织，轻轻摇晃小管。

15. 用剩余的胰蛋白酶在 37℃孵育组织 15~20min。

16. 每种组织接种两个 $25cm^2$ 培养瓶，每个培养瓶中加入 4mL 的培养基。

17. 向含组织和剩余胰蛋白酶的小管中加入 2mL 培养基，用移液管上下轻轻吹打，分散组织。

18. 让大的、未消化的组织块沉淀下来。

19. 将上清液中的细胞吸取至第一个培养瓶中，混匀，再吸取 1mL 稀释后的细胞悬液至第二个培养瓶中。此步骤在两个培养瓶中接种了两个不同浓度的细胞，省去了细胞计数。

20. 按需要换液（例如，对脑细胞来说，24h 后需要换液，但是色素视网膜的培养基可持续 5~7 天），并检查它们的特征形态和功能。

21. 根据需要，3~7 天后固定细胞并染色。

流程 D. 温胰酶消化组织

摘要：将去头的胚胎剪碎，在胰蛋白酶中搅拌几小时。每半小时收集一次解离下来的细胞，离心，加入含血清的培养基中（图 11.7）。如果在课堂上练习此步，可将多个同学剪碎的胚胎收集起来放在一个培养瓶中并在搅拌器上搅拌；如果分开做的话，用 6 个鸡胚。收集起来用胰蛋白酶一起消化，只需演示一个胚胎的

操作过程。

1. 用新鲜的胚胎，重复流程 A。
2. 用预先称重的 Petri 培养皿对胚胎进行称重。
3. 将躯体转移到 9cm Petri 皿中，内含新鲜的灭菌 DBSS。
4. 用交叉的手术刀（图 11.7）将组织剪成 3mm 小块。
5. 用大口径吸管将组织块转移到消化瓶中。
6. 移去消化瓶中剩余液体，加入 180mL 的 D-PBSA。
7. 加入 20mL 2.5%的胰蛋白酶。
8. 将磁力搅拌子加入到消化瓶中。
9. 盖上瓶子，放在温箱中磁力搅拌器上消化，或者放在温度为 37℃的温室中。
10. 转速为 100r/min，30min，37℃。
11. 30min 后，按如下步骤收集消化下来的细胞。

(a) 将碎块沉淀下来。
(b) 将上清液导入离心管中，至于冰上。用 70%乙醇和脱脂棉擦拭瓶子四周和边缘上任何残留的液体。
(c) 如步骤 5，加入新鲜的 D-PBSA 和胰蛋白酶，对留在瓶内的组织小块继续消化 30min。
(d) 从步骤 11（b）开始离心收集细胞，500g，5min。
(e) 用 10mL 含血清的培养基重悬所得的沉淀物，将悬液放在冰上。

12. 重复步骤 10，4 次，直至大部分组织都离散开来。
13. 收集悬浮的细胞。
14. 用无菌棉纱布或合适的细胞筛将大的剩余的聚集块滤去（图 11.8），或者让聚集块沉淀下来。
15. 血细胞计数板计数细胞和检查活率。
16. 用生长培养基将细胞悬液稀释到 1×10^5 个/mL，接种到 3 个 25cm^2 的培养瓶中，每个 5mL。
17. 第二天检查贴壁的细胞。
18. 3 天后，用胰蛋白酶消化并计数两瓶细胞，第三瓶细胞固定染色。

流程 E. 冷胰蛋白酶消化组织

摘要：剪碎组织放到 4℃的胰蛋白酶中 6~18h，移去胰蛋白酶后孵育，将细胞分散至温的培养基中（图 11.9）。

1. 重复流程 A。
2. 将躯体转移到 9cm Petri 皿中，内含新鲜的灭菌 DBSS。
3. 用交叉的手术刀将组织剪成 3mm 的小块（图 11.9）。
4. 用弯镊将组织转移到 25mL 或 50mL 的平底灭菌玻璃瓶或锥形瓶中。
5. 等待组织块沉底。
6. 轻轻地弃去多余的液体。
7. 加入 10mL 0.25%胰蛋白酶。
8. 将混合物放到 4℃，6~18h。
9. 仔细地弃去胰蛋白酶，保留剩余的组织及带一点点残留的胰蛋白酶。
10. 将小玻璃瓶或烧瓶放在 37℃，20~30min（此步不需要搅拌）。
11. 加入 10mL 温的培养基，用移液管轻轻地上下混匀，直至将组织充分散开。
12. 如果有些组织没有完全散开，通过棉滤布或不锈钢细胞筛（100~200μm），或用一次性的细胞筛过滤细胞悬液（图 11.8），或让大的组织块直接沉降下来。
13. 通过血细胞计数板计算悬液中的细胞浓度，记录细胞活率。
14. 用生长培养基将细胞浓度稀释到 1×10^5 个/mL，接种到 3 个 25cm^2 的培养瓶中，每个培养瓶 5mL。
15. 第 2 天观察细胞的贴壁情况。

16．3天后，取其中的两瓶细胞进行胰蛋白酶消化计数，第三瓶细胞进行固定染色（见方案18.2）。

数据


彩版3

（1）3~5 天后，检查器官原基的存活体培养物，观察心肌细胞的形态学特征、骨骼肌细胞融合（参见彩版3c）和心肌细胞收缩特征。

（2）将温消化和冷消化收获的细胞计数及活力检测。

（3）温消化和冷消化收获的细胞接种3天后，消化培养的细胞，计数。

分析

（1）试鉴别用器官原基进行原代培养的不同细胞类型。

（2）如何既繁殖这些培养的细胞又保持其特异的类型？

（3）计算每个胚胎收获的总细胞数及活细胞数，并填入表格（表27.8）。

表27.8　练习19D、E的记录和分析

胰蛋白酶消化	温的	冷的
胚胎年龄		
所用胚胎的个数或分数（N）		
重量（W）		
胰蛋白酶体积		
温度		
胰蛋白酶在4℃持续的时间		
胰蛋白酶在37℃持续的时间		
去除胰蛋白酶后，分散细胞使用的培养基的体积（V）		
细胞分散后的浓度（C）		
活力百分比（v）		
活力细胞的浓度（$C_v=C\times v$）		
收获的细胞总数（$n=C\times V$）		
活力细胞数（$n_v=C_v\times V$）		
每个胚胎总的细胞数（$T=n/N$）		
每个胚胎的活细胞数（$T_v=n_v/N$）		
每克的细胞个数（n/W）		
每克的活细胞数（n_v/W）		
每个培养瓶接种的活细胞个数（S）		
3天后每个培养瓶接种的收获细胞数（R）		
产量百分比（$R/S\times100$）		

（4）由第一次传代时（3天后）所获得的细胞计算每个胚胎产出的细胞数，并计算与接种总细胞数，接种存活细胞数的比率。

（5）染色排除法是存活率的好的指示吗？

（6）培养细胞染色后的形态学特征，比较剪碎整个胚胎后经温消化和冷消化（D和E）的区别。

练习20 单层细胞的克隆培养

目的

稀释细胞，使它们从单个细胞生长为分离的集落。证明细胞的增殖潜力，从而可分离出特殊类型细胞株。

应用

遗传或表型变异细胞的分离；存活能力分析；生长分析。

训练目标

介绍稀释法克隆培养技术；作为生长或存活指标测定贴壁效率；选择细胞类型的克隆分离。

监督：第0天开始监督，在其后（10~14天）帮助鉴定克隆。

时间：1h。

背景信息

克隆化（参见16.1节，图16.2）；贴壁效率（参见23.10节）；结晶紫染色（参见方案18.3，彩版6e、f）；**标准方案**：稀释法克隆化（参见方案16.1），贴壁效率（参见方案23.10）。**辅助方案**：条件培养基（参见方案16.2），饲养层细胞（参见方案16.3），悬浮液中克隆化（参见方案16.4和方案16.5），克隆分离（参见方案16.6和方案13.8）；克隆形成率分析（方案24.3）。



彩版6

示范材料或操作：结晶紫染色的克隆培养物；克隆培养器皿的选择，如使用培养皿或微孔培养板；用克隆环分离克隆。

▲**安全提示** 如果使用非人源细胞系，如CHO-K1，风险很小。然而，如果使用生长停止的饲养层细胞，依据所使用的阻断方法，需要注意丝裂霉素C的毒性或放射源的辐射所产生的危害。

练习20说明

概要

低密度接种对数期细胞，孵育直至集落形成。固定、染色、计数集落个数确定贴壁效率。

材料

无菌

- 晚对数期的CHO细胞，25cm^{2}培养瓶，3个
- 培养基，用UPW、去离子水、自来水制备的3批培养基（取自练习3）；Ham's F12，经5% CO_2平衡，10% FBS，每种250mL
- 0.25%胰蛋白酶，1∶250；或相当的消化酶类，10mL
- 1mL、5mL、10mL、25mL的移液管，各10个
- 6cm的Petri皿，30个
- 常规容器或试管（用于稀释），20个

非无菌

- D-PBSA，500 mL
- D-PBSA/MeOH：50%甲醇溶于 D-PBSA，500mL
- 甲醇，500mL
- 结晶紫，200mL
- 血细胞计数板或电子细胞计数器

操作步骤

1. 用胰蛋白酶消化第一瓶细胞以获得单个细胞悬液。
2. 当用胰蛋白酶消化细胞时：
   (a) 标记好 12 个培养皿（在皿底部），例如，A1、A2、A3、B1、B2、B3 等。
   (b) 标记 5 个普通容器或试管用于稀释，10^5、10^4、10^3、10^2 和 10，取出稀释步骤所用的培养基，10^5 不用加培养基，其他各加 18mL，使用 UPW 配制的培养基。
3. 当细胞变圆并开始浮起时，用 5mL 培养基吹打分散单层细胞形成单个细胞悬液。
4. 计数细胞并按如下方法稀释。
   (a) 将胰蛋白酶稀释到 1×10^5 个/mL（比例大约为 1∶10 或 1∶20，取决于培养瓶中细胞的数量），体积最小为 16mL，例如，将个数为 1.8×10^6 的 1mL 液体稀释到 18mL。
   (b) 取 2mL 浓度为 1×10^5 的细胞悬液稀释至 20mL（1∶10），浓度达到 1×10^4 个/mL。
   (c) 取 2mL 浓度为 1×10^4 的细胞悬液稀释至 20mL（1∶10），浓度达到 1×10^3 个/mL。
   (d) 取 2mL 浓度为 1×10^3 的细胞悬液稀释至 20mL（1∶10），浓度达到 1×10^2 个/mL。
   (e) 取 2mL 浓度为 1×10^2 的细胞悬液稀释至 20mL（1∶10），浓度达到 10 个/mL。
5. 上述每稀释一个浓度，就接种 3 个 Petri 培养皿，每个加 5mL 细胞悬液。
6. 将培养皿放入 5% CO_2 培养箱中。
7. 重复稀释并接种（步骤 4~6）到预标记的第二套和第三套培养皿中，分别用去离子水（DW）配制的培养基或自来水配制的培养基稀释。如果需要的话，可用胰蛋白酶消化新的细胞。当然，如果是第一步需要时间不太长的话，可以将 1×10^5 浓度作为开始稀释浓度。
8. 培养 1 周。
9. 收集培养物，去掉盖子（这就是在底部标记的原因），清洗、固定、染色克隆物。
   (a) 弃掉培养基。
   (b) 用 D-PBSA 冲洗单层培养物，弃掉洗液。
   (c) 每个皿中加入 5mL D-PBSA/MeOH，2min 后弃掉 D-PBSA/MeOH。
   (d) 加入 5mL 新鲜的甲醇，放置 10min。
   (e) 弃掉甲醇，吸干培养皿。
   (f) 加入 5mL 结晶紫，放置 10min。
   (g) 自来水冲洗，再用去离子水冲洗，并干燥培养皿。
10. 计数每皿中的集落数，50 个细胞以下的不计。放大镜观察集落数会更容易些。

数据

每皿的集落数。

分析

（1）计算贴壁效率（PE）：PE=形成集落数÷接种细胞数×100

（2）比较用不同质量的水制备培养基的结果。

（3）为什么这是血清质量检测的好方法？

（4）如何比较几个血清批次？

实验变通

（1）质量保证：设计此实验是为了验证UPW、DW和自来水的质量，也可用于验证任何一个成分，如血清，此时需要用系列血清浓度。

（2）接种浓度：贴壁效率一旦确定，此实验可用窄范围细胞浓度重复进行。

（3）细胞毒性：这个练习的一个简单变化是在克隆培养前24h加入细胞毒性药物（参见方案24.3）。如果使用丝裂霉素C，便是制备饲养层细胞有益的准备步骤（参见方案16.3），在0~50μg/mL的指数范围浓度是合适的，例如，0、0.1μg/mL、0.2μg/mL、0.5μg/mL、1.0μg/mL、2.0μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL、50μg/mL。

（4）饲养层细胞：在加入或没有饲养层细胞（参见方案13.3）条件下重复步骤1。

（5）克隆的分离：分离克隆并比较染色克隆株的形态（参见16.4节和18.4节，方案18.2和方案18.5）。

27.5 特殊练习

可以认为凡进行特别练习（练习21~27）的人们都有特定的目标，可以据此选择有关的方案。参数的变化也是由操作者的目的来决定的，所以不再提供这些练习的细节，此时，学生或实习生已有能力来设计自己的实验；或跟随或修改这些标准方案。特别练习包括在表27.1中，虽然在更高的水平，但我们认为会有很多人感兴趣而作为一个深入的培训项目。

参考文献

ANSI/ATCCASN-0002-2011 (http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2FATCC+ASN-0002-2011&sourcekeyword=_inurl:webstore.ansi.org%23inurl:sku%3Dansi&source=google&adgroup=ANSI-Standards&gclid=CIGO_c6GkcQCFWTItAod-C3EA6Q).

ICLAC (http://iclac.org/).

（薛惠文 译）

第28章

问题与对策

就一个实验室而言，无论它运作得多么好，总会因为招募新人、革新技术或拓展方向而影响原来的规程，从而产生各种各样的新问题。解决这些问题的一个方法就是确保操作规程不变，即标准操作程序（standard operating procedure，SOP），并确保仅在彻底检验所有可能的反应和征得所有操作者同意时才会改变SOP。然而，这样做往往非常困难，特别是针对科学研究，其自身的发展就在于革新和不断引入新的操作程序。

前面章节在操作程序上的建议主要集中在如何进行操作的指导，其中有些地方还提示了可能的错误。本章旨在按照标题分类总结这些潜在问题，并增加了一些潜在的困难、疑问及解决策略。

28.1 细胞异常形态

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
胞内颗粒或者空泡	细胞退化	首先检查造成细胞生长缓慢的参数，测定生长曲线和贴瓶率	从冰箱或细胞库中更新冻存细胞，确定合适的培养条件	见图12.1；方案23.7~方案23.10
	吞噬作用	在高倍显微镜下观察中性红或者荧光葡聚糖（如Sigma公司的FITC-葡聚糖）		
胞外颗粒	污染	检查颗粒大小是否一致，如有疑问，可将培养基加到营养琼脂培养基上培养	维持无抗生素培养；使用荧光染料Hoechst 33258检查，如有污染则弃去	见14.3节
	培养基或血清中的沉淀	在显微镜下观察颗粒大小的变化，如有疑问可在血琼脂培养基上培养	检查培养基中的沉淀（可能意味着某种成分的丢失），检查血清中的沉淀（通常无害）	见28.3.1节
双折射消失（细胞边界模糊）	可能由干燥造成的死亡	用胰蛋白酶消化并用染色排除死细胞，检查活细胞是否贴壁，如不能贴壁则弃去	检查每一个步骤以确定哪一步造成干燥（如一次向大量培养板中加入培养基）	见24.3.1节和24.3.5节；彩版17a



彩版17

28.2 细胞生长缓慢

28.2.1 仅限于自己细胞出了问题

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
污染	明显的污染	用肉眼进行检查	如有污染则弃去细胞	见 14.3.1 节、28.5 节；图 16a~c
		用显微镜进行检查	如有污染则弃去细胞	见 14.3.1 节和 28.5 节；图 14.2a~c
	隐藏的污染	检查支原体		见方案 14.1 和方案 14.2
			如有污染则弃去细胞	见 14.4 节
			检查可能污染的途径和原因	见 14.1 节；表 14.1
培养基和试剂	检查其他的培养基和血清	检查不同批次	使用不同供应商或不同批次 1×、10×的粉末	见 10.6 节
	如果是培养基的问题		确定原因，变更供应商或产品	见 28.3 节
	如果是胰蛋白酶或其他消化试剂的问题	检查是否更换了批次和供货商	使用新的批次和供货商的产品	见 11.1.1 节；表 12.4
		检查消化时间，消化液的浓度和温度	必要时重新规范程序	见 12.4；表 12.4
		吹打细胞是否过于剧烈	温和吹打细胞	
		检查 EDTA 的毒性	如果有毒性，撤掉或者更换 EDTA	附录 I：TEGPED
		检查稀释液	更换稀释错误或劣质的胰蛋白酶消化液	
细胞状态	检测细胞：复苏另一支冻存的细胞，分别进行培养	绘制生长曲线	检查传代时接种密度是否过低；细胞传代是否过于频繁；细胞处于平台期是否时间过长	见 12.5.3 节；方案 23.7 和方案 23.8

28.2.2 其他人也遇到同样的问题

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
孵育				
孵箱或温室的温度控制	自动调温器损坏	检查温度计	请维修工程师	见 4.3.1 节和 4.3.3 节
	风扇损坏	检查温度计	请维修工程师	见 4.3.1 节和 4.3.3 节
	孵箱门开闭过于频繁	检查温度计	注意操作	见 4.3.1 节和 4.3.3 节
	孵箱门未关紧	检查温度计	注意操作	见 4.3.1 节和 4.3.3 节
孵箱湿度	水盘中未加水	在事先称重的培养皿中放置一定量的 D-PBSA，每日称重，以检查蒸发率	变更加水的操作规程	见 4.3.2 节
	箱门存在渗漏	检查孵箱密封情况	请维修工程师	见 4.3.2 节
	开关孵箱门过于频繁	检查蒸发率	减少开关门次数	见 4.3.2 节

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
孵育				
CO_2浓度	孵箱门开并过于频繁	检测CO_2浓度	减少开关门次数	见4.3.2节
	CO_2控制器	监测标准培养基在箱内的pH，用CO_2探头（Carborite，Cole Parmer）检测CO_2含量。用标准混合气重新校准	请维修工程师	
培养基和试剂	供货商、批次、类型、存储期限出现问题			见28.3节
近期变化				
细胞培养相关人员	新员工，培训或过于拥挤	检查变化	重新规范规程	
准备过程	人员问题	检查变化	重新规范规程	
	操作规程或培训	检查变化	重新规范规程	
材料	化学污染	测定生长曲线或细胞集落形成率，与对照培养基相比较	跟踪排除污染	见28.6节；方案23.8、方案24.3、方案24.4
操作过程	孵育时间、操作速度、操作顺序、位置、范围大小	检查操作过程	重新规范规程	
仪器设备	新仪器	检查性能	找供应商	
	运行状况	找出错误	请维修工程师	
	摆放位置，自身或邻近的仪器移动过	变更摆放位置		见3.2节
	操作温度（如孵箱，见上；水浴；离心机）	测定温度	制定新的常规；请维修工程师	

28.3 培 养 基

28.3.1 试剂配方、准备和存储

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
培养基储存液是个人专用还是与他人共用？	违规操作	检查每个使用者	规范操作	见6.10.1节
更换培养基的种类	培养基配方不合理	回复到原来的培养基	如果需更换，要挑选培养基和血清	见10.6.3节
			使新培养基和以前的培养基种类和供应商匹配	
			尝试无血清配方	见9.6节
储存时间	有效期	检查培养基的批次和购买时间	修正存货控制；在4℃条件下保质期为6个月	见10.6.4节
	谷氨酰胺降解	购买不含谷氨酸的培养基，将谷氨酰胺冷冻存储于–20℃，使用前加入	规定储存条件，试用更稳定的Glutamax（Life Technologies）	见8.4.1节
	温度	持续检查温度	定期维修	
	光	避光保存	使用钨灯或者低强度紫外线灯	见10.6.4节

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
换液频率	培养基酸度太高	检查细胞污染，提高换液频率	修改换液时间或增加培养基中的缓冲液	见 8.2.3 节和 12.4.2 节
pH 波动	孵箱或者 CO_2 进气故障	pH 保持在 7.0~7.4	请维修工程师	
pH 过高	孵箱中的 CO_2 浓度过低	重新校准	请维修工程师	
	培养基中 HCO_3^- 浓度过低	配制新培养基并平衡过夜后使用	检查培养基的配方	见方案 10.8
DMEM 培养基的 pH 高	DMEM 要求 CO_2 浓度为 10%	增加 CO_2 浓度或降低 HCO_3^- 浓度	购买或制备不含 HCO_3^- 的 DMEM 培养基，并在使用前加入	表 8.1 和表 8.3
摩尔渗透压	培养基配方有误，稀释不准确，添加了新组分或性质不确定的化合物	检查摩尔渗透压	检查制备过程，用无菌的氯化钠或超纯水调节	见 8.2.5 节
培养基缺陷	不适用的配方	与 1×培养基和其他的培养基对比	考虑添加激素和生长因子等	见 8.6 节和 9.4 节
	意外忘记添加某种成分	重新配制一批新鲜培养基	与以前用的培养基对比检查	
	溶解性差	确保所有培养基成分在过滤前已完全溶解	修正操作规程	见 10.4.4 节
	存储中产生沉淀	37℃加热，使用前过滤时确保沉淀都已溶解	如沉淀不溶解则弃去，询问供应商	见 10.6.3 节
	某一成分失效	从其他渠道购买，每次替换一种有效成分	做好批次记录，联系供应商	见 10.6.3 节
	新批次培养基质量问题	与老批次的培养基进行比对	更换供应商	见 10.6.3 节
血清	新批次血清质量问题	将新旧批次的血清进行比对检测	重叠期后在多种新批次血清中选择最佳的一种	见 8.6.1 节和 10.6.3 节
稀释液	若培养基是以平衡盐溶液配制的，则平衡盐溶液是否符合要求？	将配制的培养基与商品化的新鲜 1×培养基进行比较	尝试不同来源的平衡盐溶液或不同的配方	
	若培养基是用水配制的，则超纯水是否符合要求？	将配制的培养基与商品化的新鲜 1×培养基进行比较	检查超纯水	见 10.6.3 节、23.10 节、24.3.5 节
进行新的细胞培养时培养基的选择	未能预知的	筛选培养基的类型、血清和血清浓度		见 8.6 节、10.6.3 节，表 9.3
		将新老批次的血清进行对比检验	重叠期后在多种新批次血清中选择最佳的一种	见 8.6.1 节和 10.6.3 节
		尝试无血清培养	根据不同组织的标准进行筛选（例如，用于培养表皮角质细胞的 MCDB 153）	见 9.5 节和 9.6.2 节
		检查激素、生长因子等添加物		见 9.4.5 节，表 9.4
		尝试用饲养层、ECM 或条件培养基		见 7.2.1 节，8.7.3 节、16.2.2 节、16.2.3 节

28.3.2 不稳定试剂

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
谷氨酰胺	在37℃不稳定，产生氨	存储于-20℃	检测并用稳定的二肽替代（如 Life Technogies 公司的 Glutamax）	见 8.4.1 节和 8.8 节
血清	某些不稳定的成分（如胰岛素）	存储于-20℃	换用无血清或血清替代物	见 9.5 节和 9.6.2 节，表 9.3
	部分融化	彻底溶化后混匀，再行冻存	分装使用	
其他成分	某些添加成分可能不稳定	分装单次使用	把要添加的成分等分成若干份存储，每份使用一次后弃去，避免再次冻存	
胰蛋白酶	不稳定	分装冷冻保存浓缩的胰蛋白酶储存液	以浓缩液稀释后的工作液于4℃最多存放2周	

28.3.3 配制培养基各种成分的纯度

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
水质问题	不明原因	收集超纯水，与可信的超纯水和1×培养基检测对比	遵循下列步骤	见方案 23.7 和方案 23.8；23.10 节
	反渗透膜	检测出粗纯水的电导率和总有机碳含量	更换反渗透膜，建立定期更换制度	见 10.4.1 节和 10.4.2 节；图 10.9
	蒸馏	检测粗纯水的电导率	清洁蒸馏系统，建立定期清洁制度	见 10.4.1 节和 10.4.2 节；图 10.9
	去离子装置	检测纯水的电导率	更换去离子装置，建立定期更换制度	见 10.4.1 节和 10.4.2 节；图 10.9
	活性炭罐失效	检测总有机碳（Millipore）	更换活性炭罐，建立定期更换制度	见 10.4.1 节和 10.4.2 节；图 10.9
	树脂泄漏	更换微孔过滤器	建立定期更换制度	见 10.4.1，10.4.2 节；图 10.9
	管道被污染	肉眼检查是否有藻类	清洗或更换管道	见 10.4.2 节
碳酸氢盐	浓度有误	对比标准溶液的参数检查储存液的电导率和摩尔渗透压	尝试用其他批次的产品（自己配制或购买）	见 10.6.1 节
		检查用量是否准确	修改培养基的配制方法	见 8.2.2 节；表 8.1~表 8.3、表 9.1、表 9.2
		检查孵箱的 CO_2 浓度	重新校准或请维修工程师	见 8.2.2 节
	储存液有沉淀	目测检查	尝试用其他批次的产品（自己配制或购买）	
抗生素毒性	浓度过高	降低浓度	不用抗生素	见 8.4.7 节
	批次有问题	与新批次对比检验	不用抗生素	见 8.4.7 节
	联合应用抗生素	试用不同组合	不用抗生素	见 8.4.7 节
	真菌抑制剂（如具有毒性的两性霉素 B）	换为制霉菌素或其他真菌抑制剂	仅在分离原代细胞时使用	见附录 I：Collection Medium，DBSS
抗生素耐药	频繁使用	更换抗生素（Sigma-Aldrich 目录）	不用抗生素	见 8.4.7 节

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
血清	类型错误	试用新类型血清或血清替代品	用无血清培养基替代	见9.5节和10.6.3节
	批次问题	选择新批次并与前批次作比较	大量订货前检测新批次	见8.6.1节和8.6.2节
		检查供应商质控证明	选择新供应商	见补充材料的附录III
	浓度过高或过低	通过测定生长曲线和（或）集落形成率检测血清浓度使用范围	更换批次血清或用无血清培养基替代	见方案23.7、方案23.8、方案23.10；见9.5节和9.6.2节

28.4 基质和容器

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
塑料制品	批次有问题	与对照批次对比，检测贴壁率	更换批次或供应商	见方案23.10
玻璃器皿	未清洗彻底，有残留物污染	检查清洗程序；目测玻璃器皿；用玻璃瓶或有盖皿培养细胞测试贴壁率	修正清洗程序；保持化学试剂瓶与培养瓶分开放置	见4.5.1节、10.3.1节
	通用器皿或限于一个使用者的器皿	检查规程及所用玻璃器皿的不同之处	修正清洗程序；换用塑料制品	见7.1.2节和10.3.1节
	普遍存在或限于一种细胞	如果是一种细胞，尝试包被玻璃器皿或用酸处理	换用塑料制品	见7.1节、7.2节
	显微镜载玻片	用强酸清洗	尝试包被；使用塑料载物片（可能不利于荧光观察）	见7.2节和18.4.3节
瓶盖	有洗涤剂残留在衬垫上	清洗衬垫	使用无填塞的瓶盖	见10.3.3节

28.5 微生物污染


彩版16

参见图14.1；亦可参见表14.1；图5.1，图14.2；彩版16。

28.5.1 仅限于单个实验者的问题

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
偶发污染				
单一微生物	无菌操作技术中的偶尔失误	监控操作技术	重新加强培训	见5.3节、5.4节；27.2节练习1；27.3节练习8，练习9
	个人卫生问题	检查操作者的卫生状况	洗手；戴手套；更换细胞培养的实验服；扎好长发	见5.3节、5.4节
		培养基或试剂是否为该操作者单独使用	检测并确定污染源	见14.3节
多种微生物	无菌操作技术普遍忽视的问题	确保超净台整洁；放在洁净台上的物品应消毒；所有的溢出液体应立即清洁干净	培养操作开始之前是否更换实验服？实验服是否扣紧？	见5.3节、5.4节
		联系使用同一超净台的其他实验者	超净台可能有损坏，需要维修	见4.2.1节

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
反复污染				
单一微生物	通常来自试剂或外来的细胞系	确认培养基或试剂是否为个人专用；某一细胞系是否仅限于某个人使用?	弃去培养基、试剂或细胞系；保证将来的外来细胞系经过隔离检疫	见 3.2.4 节、14.4 节和 14.1.8 节
多种微生物	无菌操作的长期问题	找出无菌操作的众多疏漏点	检查培训过程	见 5.3 节、5.4 节、27.2 节、27.3 节
	采用非标准程序	明确正确的程序	检查培训过程	见 5.3 节、5.4 节、27.2 节、27.3 节
	超净台内物品拥挤	分层摆放整齐	检查培训过程	见 5.2.1 节；图 5.4
	实验室拥挤；人流过多	限制进入	超净台的使用采取预订系统	
	非灭菌试剂	移除超净台中的非灭菌试剂	检测并更新规范标准操作程序	
	使用普通实验室或动物室的实验服	检查实验服的使用	为细胞培养提供洁净的外衣或外套	见 5.2.4 节
持续污染				
单一微生物	试剂长期被污染	检查所用试剂和培养基	将不含抗生素的培养基与营养肉汤（如 LB）1∶1 混合，孵育培养；也可将怀疑被污染的培养基或营养肉汤铺于血琼脂板上，倒置，另设空白对照	彩版 16d，图 10.16
		检查长期污染的细胞系	以 Hoechst 染色法检测细胞；将肉汤与细胞混合，进行培养	见方案 18.2、10.6.2 节、图 10.16
多种微生物	忽视无菌技术操作规程	监控无菌操作技术；查找非标准规程	重新参加培训	见 5.3 节、5.4 节、27.2 节、27.3 节
	位置不佳	减少拥挤、设备和人员流动	调整无菌室的布局	见 3.2.1 节
	超净台内物品摆放拥挤	分层摆放整齐		见 5.2 节；图 5.4
	使用未经灭菌的试剂	移除洁净台上的非灭菌试剂		


彩版 16

28.5.2 普遍问题

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
偶发污染				
单一微生物	不常使用的某种试剂或培养基被污染；经常使用的某种试剂或培养基被轻度污染	筛查试剂和培养基	用营养肉汤培养，也可将培养基铺于血琼脂板进行测试培养	见 10.6.2 节；彩版 16d；图 10.16
	孵箱被污染	检查孵箱；擦拭，不明显时可将擦拭后的纱布进行培养检测	必要时彻底清洗	见方案 5.4
多种微生物	空气中微生物孢子数增多（操作者过多、施工、季节因素）	利用实验间歇时放置细菌检测平皿加以检查；用真空过滤器和细菌检测平皿抽样检查空气	减少产生孢子的活动；检查室内空气过滤系统；改善大气过滤装置	见 4.2 节
	高温烤箱问题	（1）减少物品拥挤，以免阻碍空气充分流动 （2）检查烤箱门及其他孔隙的密闭性 （3）检查烤箱的灭菌温度和时间：160℃至少 1h	检查烤箱内物品摆放和灭菌程序；确认温度探头和指示器放置在中心位置	参见 10.2 节；图 10.7

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
多种微生物	高压灭菌锅有问题	检查高压锅： （1）锅内物品切忌摆放拥挤，以免阻碍蒸汽充分流动 （2）灭菌过程的温度和时间：121℃ 15~20min	检查灭菌锅内物品摆放和灭菌程序；确认温度探头和指示器放置在中心位置；确认所有空容器的口敞开，以使蒸汽环流；确认包裹可被蒸汽穿透	见 10.2 节；图 4.18；彩版 22a
	引入未经培训的新员工；未按标准规程操作	与管理人员检查新员工的训练	必要时更新训练规程	见 5.3 节、5.4 节、27.2 节、27.3 节
反复污染				
单一微生物	试剂或培养基被污染	在使用者中检查公用试剂的使用频率，以缩小在常用试剂中查找问题的范围	将可能有问题的试剂与培养基（试剂）与肉汤 1∶1 混合，孵育培养	见 10.6.2 节；彩版 16d；图 10.6
	孵箱污染	检查孵箱；擦拭，必要时可将擦拭后的纱布进行培养检测	必要时彻底清洗	见方案 5.4
	BSC 有缺陷或污垢	清理下部托盘	检修 BSC	见 4.2.1 节
多种微生物	高温烤箱或高压灭菌锅问题	（1）检查高压灭菌锅和高温烤箱内物品摆放是否过于拥挤 （2）检查高压灭菌锅和高温烤箱是否有电路和机械故障	（1）检查灭菌过程的打印输出和记录 （2）检查高温烤箱的密封是否完整	见 10.2.1 节、10.2.2 节、10.4 节；图 4.18 和图 10.7；彩版 22a
	规程错误，制备和灭菌的问题	检查新员工是否遵守操作规程	（1）检查新员工的培训 （2）与管理人员检查操作规程 （3）检查操作规程的变化和要求 （4）重新制定标准操作程序以适应情况的变化	见 6.3 节、6.10.1 节、27.2 节
	冷藏空间被污染	肉眼检查，必要时擦拭	（1）制定有关冷存设备定期清理规则 （2）将已灭菌的物品存放于密封的包装中 （3）检查灭菌物品的更换	见 10.6.4 节、14.1.5 节
	灭菌技术有误	检查操作人员的灭菌技术；限制使用抗生素		见 5.3 节、5.4 节、8.4.7 节、27.2 节、27.3 节；图 12.9


彩版 22


彩版 16

28.5.3 室内供气和层流净化工作台

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
生物安全柜有问题	生物安全柜损坏或有污垢	（1）用含 70%乙醇的酚类消毒剂擦拭工作区域表面及侧面 （2）清洗工作台下区域；用含 70%乙醇的酚类消毒剂擦拭 （3）检查其他管道部分是否有渗漏或者污染 （4）检查滤器是否肮脏或者阻塞（例如，通过过滤器后压力降低） （5）用风速计或营养琼脂平皿检查过滤器是否密闭完好	检查清洗时间表，并在必要时更新。检查维护保养时间表，并在必要时更新	见 4.2.1 节、5.2.1 节、5.4 节

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
培养室内空气质量	室内空气受到污染	利用实验间歇期，将敞口的细菌检测平皿放置于操作间中，以检测孢子污染；用真空过滤器和细菌检测平皿抽样检查空气	减少产生孢子的活动；检查室内空气过滤系统；改善大气过滤装置	见3.1.3节
	新进设备	清洗和擦拭设备	检查标准操作程序	见5.5节
	附近有施工场所或其他因素干扰	改善培养室的封闭状况（如关门、增设屏风、非培养室人员免入、清洁所有进入无菌操作间的仪器和物品）	提醒使用者风险隐患的范围和持续时间	

28.5.4 特定污染


彩版16

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
细菌，真菌	见本节前述	使用高倍相差显微镜检测细胞或培养基中细菌和真菌污染	使用肉汤培养细胞；将细胞接种于血琼脂平皿上，孵育培养；对细胞进行革兰氏染色，或咨询微生物专家；仅对非常重要的细胞系去污染	见10.6.2节；图10.16
支原体	引入细胞系或活组织切片	对新进细胞或活组织切片的原代细胞采取隔离检疫	根除 确定本室有效的检测方案或将样品送外检测（见补充材料中的附录III：支原体的检测）	见14.5节；方案14.3 见14.3.2节~14.3.7节；方案14.1和方案14.2；彩版16e、f
			根除	见14.5.2节； 方案14.4
	无菌操作技术差	与其他员工比较	重新强调预防措施	见14.3.2节，27.3节
	天然产物	与其他员工一起检测	利用荧光或PCR检测	见方案14.1和 方案14.2
	抗生素抑制	不使用抗生素培养一段时间后进行检测	采用荧光或PCR检测，仅限于在原代细胞及关键实验中使用抗生素	见方案14.1和 方案14.2
病毒	引入的天然产物，如血清	使用指示细胞系利用下列方法筛选：透射电镜或扫描电镜、免疫染色、酶联免疫吸附分析（ELISA）、PCR	从无病毒的来源获取天然产物	
	细胞系	隔离检疫；利用透射电镜或扫描电镜、免疫染色、PCR进行筛选	从无病毒的来源获取细胞系	见14.1.8节
			无法根除	

28.6 化学污染

28.6.1 玻璃器皿

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
清洁后残留物	清洁不彻底；顽固污渍	目测；加入少量含有酚红指示剂的平衡盐溶液并观察pH变化；在干烤灭菌的培养皿上进行克隆细胞检测；谨慎选择洗涤剂	组织培养用玻璃器皿要与化学试剂玻璃器皿分开存放；确认洗瓶机中没有任何上次清洗的化学物品的遗留	见10.3.1节
微尘污染	存储时积尘	用铝箔纸包裹所有敞口容器；将器皿存储于无尘区域或容器中	谨慎计划存储，轮流使用存货	见10.6.4节

28.6.2　移液管

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
清洗后仍有残留物或阻塞物	清洗时水流不足；顽固污渍（如变性的蛋白质或琼脂）	不允许使用玻璃移液管吸取琼脂；收集移液管后浸入洗涤剂，但只用清水漂洗；洗涤前要确认棉塞已取出；确认移液管在清洗和干燥时吸嘴（头）朝上	洗涤后高压灭菌前，应目测检查吸液管；加入小体积含有酚红指示剂的平衡盐溶液并观察 pH 变化；考虑使用一次性塑料移液管	见 10.3.2 节

28.6.3　水的纯化

参见 10.4.1 节，28.2.1 节。

28.6.4　低温冻存

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
DMSO 被污染	DMSO 溶解了容器中的塑料或橡胶	用玻璃吸液器或聚丙烯枪头操作	存放 DMSO 的容器及其盖均应为玻璃或聚丙烯制成	见 15.3.3 节
甘油毒性	甘油长期保存后分解	购买少量试剂，在 3~6 个月用完	将试剂保存于棕色瓶中	见 15.3.3 节

28.6.5　粉末或气溶胶

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
粉末或气溶胶散播	在通风区域或层流区操作	称量粉剂或分配液体时避免空气对流；处理可产生粉剂或胶体的有毒化学药品时需在通风橱或化学安全柜内操作	在培养室和准备区内控制人员和仪器进出；为培养室准备洁净的实验服	见 6.5.4 节；图 6.5b

28.7　原 代 培 养

28.7.1　原代培养的存活率低

原代培养细胞的存活率一般为 50%~90%。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
组织外植体不贴壁	外植体过大	修整外植体的大小至1mm或更小	实施切割	见方案 11.4 和方案 25.9-Su
	外植体的黏附性差（纤维过多或分化过高）	刮去外植体基质；将外植体贴到盖玻片上；包埋在血浆凝块中	尝试在培养皿底铺上胶原层粘连蛋白、纤连蛋白、多聚赖氨酸等细胞外基质；使用饲养层	见 7.2 节；方案 16.3、方案 25.9-Su、方案 25.10-Su
细胞离散不彻底	蛋白酶消化不充分	适当延长蛋白酶消化细胞的时间	短时间蛋白酶消化前尝试冷预处理；试用其他或额外的蛋白酶	见 11.3.4 节；方案 11.7；表 11.2、表 12.4
	细胞裂解产生的 DNA 促进细胞重新聚集	离心后加入 DNA 酶（10~20μg/mL）以去除蛋白酶的影响	改进离散方法，降低细胞损伤（见上述）	见 11.3.6 节；方案 11.7~方案 11.9
细胞离散彻底但贴壁差	细胞贴壁较差	如果漂浮的细胞依然存活	尝试在培养皿底铺上胶原层粘连蛋白、纤连蛋白、多聚赖氨酸等细胞外基质；使用饲养层	见 7.2.1 节和 7.2.2 节；方案 16.3、方案 25.1-Su、方案 25.3-Su、方案 25.28
	细胞悬浮生长	用悬浮培养	检查培养基中是否加入了 Ca^{2+}（RPMI1640 中缺乏）	见 8.4.3 节
悬浮细胞大多数为死细胞	蛋白酶或机械消化后存活率低	根据活细胞计数调整浓度	去除死细胞	见方案 11.11
		改进离散程序	用预冷的胰蛋白酶化或其他蛋白酶（如中性蛋白酶或胶原酶）	见11.3.4 节~11.3.7 节；方案 11.7 和方案 11.8
	组织坏死	去除坏死组织	去除死细胞	见方案 11.11
悬浮细胞均已死亡，细胞几乎不贴壁	细胞密度太低	将细胞密度提高到 1×10^6 个/mL	去除死细胞；改进离散程序（见上述）	见方案 11.11
	细胞贴壁较差	尝试在塑料培养皿底铺上基质、胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白或多聚赖氨酸	使用饲养层	见 7.2.1 节和 7.2.2 节；方案 16.3、方案 25.1-Su、方案 25.3-Su、方案25.9-Su、方案 25.28
悬浮细胞均已死亡，细胞几乎不贴壁	所用的酶毒性太强	更换为不同的蛋白酶；缩短消化时间	孵育前使用蛋白酶进行冷预处理	见 11.3.4 节和 11.3.6 节；方案 11.7；表 12.4
	培养基酸性过强	检测是否有污染；降低细胞接种浓度	如有污染应弃去	见 14.3 节和 14.4 节；彩版 16a~c
		添加 HEPES 缓冲液，增加培养瓶通气		见 8.2.3 节
	使用错误的培养基	尝试一系列培养基	查看文献中该细胞所用的培养基	见 8.6 节；表 8.3、表 8.7、表 9.1~表 9.5
	培养基添加物	使用不同种类或不同批次的血清	参考相关文献	见 8.6.2 节、9.4.2 节
		改用无血清培养基	参考相关文献	见 9.6 节
		使用不同生长因子或其他分裂素	参考相关文献	见9.4.4 节和9.4.5 节；表 9.4
		使用条件培养基	参考相关文献	见 8.7.3 节；方案 16.2.2


彩版 16

28.7.2 选择细胞错误

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
基质细胞生长过快	基质细胞占优势或培养基利于其生长	使用选择性培养基	用 MACS、FACS 等纯化细胞群	见 9.2 节、16.6 节、17.3.1 节、17.3.2 节
		使用选择性基质		见 7.2.1 节和 16.7 节
		使用选择性饲养层		见 16.2.3 节；方案 25.1-Su、方案 25.3-Su、方案 25.28
			检查来自于饲养层或异源种植块的交叉污染	见 13.1.4 节；方案 13.1~方案 13.4
不同种类的快速生长的细胞过度增殖	交叉污染	检查当前培养的其他细胞系	如有污染则弃去	见 13.1.1 节；方案 13.1~方案 13.4；表 13.1；[ICLAC, databases]

28.7.3 污染

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
微生物污染	组织感染	预先用 70%乙醇清洗组织	检查组织采集程序；在采集培养基中加入抗生素	见 25.12 节；方案 11.3，步骤 7；附录Ⅰ：收集培养基和 DBSS
		仅在组织样品无法替代的情况下才去除污染		见 14.5 节

28.8 分　化

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
细胞不分化	缺乏诱导物	使用激素、生长因子等	优化每种物质的使用浓度	见 19.7 节和 19.9 节
		与饲养层和（或）基质共培养	筛选合适的饲养层和（或）基质组成	见 19.7.1 节和 19.7.3 节
	细胞选择有误	在原代培养中使用选择性培养基	在选择性培养基中增殖	见 9.2 节；表 9.1 和表 9.2
		用 MACS、FACS 等纯化细胞群	在选择性培养基中增殖	见 17.3 节、17.4 节、9.2 节；表 9.1 和表 9.2
丧失产物形成能力	缺乏诱导物	使用诱导条件		见 19.7.1 节、19.7.3 节、19.7 节、19.9 节
	遗传不稳定，错误的克隆/亚细胞系过度增殖	复苏冻存的细胞或分离新细胞系	重新克隆；检查克隆的活性	见 16.1 节和 16.2 节

28.9 饲　　养

28.9.1 常规单层培养

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
pH 下降过快	污染	检查是否有细菌污染	检查操作程序	见 14.3 节
	培养基耗尽	提高换液频率	检查培养基是否适合	见 8.6 节和 9.5 节
	有乳酸产生	在培养基中添加 20mmol/L HEPES 缓冲液或增加 CO_2/HCO_3^- 的浓度以提高缓冲能力	使用带滤盖的培养瓶	见 8.2.2 节和 8.2.3 节
换液后 pH 上升	空气中孵育时，培养瓶密闭不严而漏气	拧紧瓶盖	降低 HCO_3^- 的浓度；使用 CO_2 培养箱和可透气培养瓶盖	见 7.3.3 节、8.2.2 节、8.2.3 节
	在 CO_2 培养箱内培养时，瓶口有液体封口薄膜形成	用无菌纱布封住瓶颈；更换新瓶盖	使用可透气培养瓶盖	见图 7.8
	在 CO_2 培养箱内培养时，培养皿的盖缘有液体封口薄膜形成	移去皿盖，用 70%乙醇擦拭边缘，更换皿盖	检查操作，避免培养基进入培养皿底和盖子之间的毛细空间	见 5.4.2 节；方案 5.3
	HCO_3^- 的浓度过高	降低 HCO_3^- 的浓度	检查培养基的配方是否正确	见 8.2.2 节
	CO_2 浓度过低	增加 CO_2 的浓度	检查培养基的配方是否正确；检查 CO_2 培养箱是否校准	见 4.3.2 节和 8.2.2 节

28.9.2 克隆培养

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
pH 过高或过低	见上述			见 16.1 节和 28.3.1 节
预防污染	源于潮湿培养箱的污染	将培养皿（板）的盖丢弃，尤其是其上有培养基的时候，并用 70%乙醇擦拭培养皿（板）的外侧底部	在盒中孵育培养皿，开盒前应擦拭盒子；培养箱中不要使用风扇	见 5.5.3 节
	培养箱有污垢	彻底清洁培养箱	修改清洁程序	见方案 5.4

28.10 传　　代

28.10.1 收获率低或生长缓慢

细胞系的存活率一般为 90%~100%。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
生长周期	传代时细胞处于平台期	在指数期或指数生长末期传代	查看或重绘生长曲线	见 12.5.3 节；方案 23.7~方案 23.9

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
生长周期	接种密度错误	调整接种密度以保证在下次传代前有最短的延迟期和对数生长末期时间	查看或重绘生长曲线	见12.5.3节；方案23.7~方案23.9
	传代过于频繁	只在对数生长末期传代	查看或重绘生长曲线	见12.5.3节；方案23.7~方案23.9
衰老	细胞培养代数过多（倍增）	检查传代次数	查看细胞系的有限生命时间的长度	见2.7.3节、22.3.1节；短篇综述22.1
		常规性地用冻存细胞替换	保证充足的冻存细胞	见15.4.2节
		细胞系永生化	确定永生化对细胞的表型和生长特性的影响	见22.3节；方案22.1和方案22.2；短篇综述22.1
培养基缺乏	见上述			见28.3节
毒性	化学污染	通过绘制生长曲线、微量滴定法或接种率的方法检查培养基中的各种成分		见28.6节；方案23.7~方案23.10、方案24.3、方案24.4

28.10.2 生长不均匀

可参见7.3.5节，28.11.3节。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
培养皿或孔的边缘的细胞较多	弯液面效应；培养基不足	增加培养基的体积	调整细胞浓度使细胞密度恒定	见12.5.3节和23.9.4节
培养皿中心的细胞较多	吹打或混合细胞时培养基形成漩涡	加细胞和混合时随机混匀，不要形成漩涡	更新操作程序	
培养板的孔中心的细胞较多	清洗或加入培养基时从孔边缘冲刷细胞	清洗和换液时小心操作	测试前用乙醇固定有助于细胞保持贴壁状态	见24.3.5节
微量滴定板的边缘孔内细胞数较少	“边缘效应”：可能由于外侧的孔蒸发较快	不要使用板边缘的孔	用板密封器取代盖子	见24.3.5节
培养皿或培养板一侧的细胞数多于另一侧	培养器皿不水平	水平放置培养器皿，封口和叠放的大培养瓶应短暂通气	检查托架和（或）培养箱是否水平放置	图5.10
培养瓶内出现螺纹或图案结构，或是培养皿内出现同心圆	受风扇马达振动或门开和关的振动影响	关闭或更换风扇；在培养瓶、皿、板下面放置软垫；当细胞分布非常重要时（如克隆的形成）限制培养箱的其他使用	检查培养箱的稳定性和维护；重新分配培养箱空间	见7.3.8节；图7.10
	加热不均	将培养瓶或培养皿放在一个隔热瓷砖或金属板上	检测培养箱内空气和温度的分布是否均匀	见4.3.1节和4.3.2节

28.11 克　　隆

可参见28.2节。

28.11.1 培养皿形成的克隆数过低

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
贴壁率低	接种浓度过低	提高接种浓度	使用一系列接种浓度来确定贴壁率	见16.1节；方案16.1
		补充培养基	使用糖皮质激素、胰岛素	见16.2节
		使用饲养层或条件培养基	在不同的饲养层或条件培养基中筛选以获得最佳效果	见16.2.2节和16.2.3节；方案16.2和方案16.3
	操作技术差；操作时间过长	加快操作或使其更加合理化		
	培养箱内的蒸发	更换培养基	检测培养箱内的湿度；在同样的条件下，培养开始时和培养了一段时间后分别测定培养皿的重量，以确定培养基蒸发量	见4.3.2节
	培养基不适合克隆形成	选择高营养培养基（如Ham's F12）	在一系列高营养培养基中筛选优化	见8.6节和9.6节
	CO_2浓度过低	优化CO_2水平		见8.2.2节
	血清问题	对于细胞克隆的形成而言，使用胎牛血清培养效果要优于小牛血清或马血清；如已使用胎牛血清，尝试提高血清浓度	根据所用细胞的贴壁率选定合适批次的血清	见10.6.3节；方案23.10；彩版6e
	塑料制品不适合	检查塑料制品的来源，必要时及时更换	比较不同来源的培养皿	见10.6.3；方案23.10
	表面电荷问题	使用基质包被塑料器皿	选择携带电荷不同的塑料制品如Primaria，CellBIND（Corning），FN/V/BSA	见7.2.1节；方案7.1和方案25.9-Su
	支原体污染	筛查支原体	如果被污染的细胞系不可替代，可将根除支原体作为最后的手段	见方案14.2、方案14.3；彩版16e、f
集落过于弥散	细胞间黏附力降低；细胞迁移增加	使用大一些的培养皿使集落有足够空间延伸	接种细胞时使用糖皮质激素（例如，地塞米松1~10μmol/L）	见16.2.1节
			使用基质包被培养皿	见7.2.1节；方案25.9-Su
集落贴壁不佳	细胞黏附性低或基质不佳	使用铺加了甲基纤维素的组织培养专用培养皿进行细胞克隆		见方案16.5


彩版6


彩版16

28.11.2 培养皿形成的克隆数太多

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
克隆相互重叠，难以计数或分离	接种浓度过高	降低接种密度（个/mL）或将同样数量的细胞接种到更大的培养皿中	使用一系列接种浓度来确定贴壁效率	见 16.1 节；方案 16.1
		缩短克隆生长时间	确定集落形成的最佳时间	

28.11.3 非随机分布

可参见 28.9.2 节。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
克隆分布不均匀	接种不均匀	将细胞转移到盛有培养基的试剂瓶中，混匀后再接种到培养皿中		
	摇动培养皿	在混匀或吹打细胞时不要摇动培养皿		
	培养基未覆盖全皿	确保培养皿底部完全被培养基均匀覆盖	确保培养皿水平放置及培养箱不受振动	见 23.9.4 节
	培养箱振动	限制其他人员使用此培养箱；在放置培养皿的盒子或托盘上标记："正在进行克隆，勿动！"	检查培养箱振动，是否用电扇，是否靠近离心机、冰箱或冷藏箱	

28.12 交叉污染和错误标记

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
交叉污染	意外混淆，与他人共用吸量管或试剂，同时操作两种细胞，引入未经鉴定的冻存细胞	定期检查所有细胞系；遵循 14.6 节提及的规则	弃去所有污染细胞，更换为可靠的冻存细胞	见 13.1 节
		如果能及早发现，可通过细胞克隆分离或物理分离分出原始细胞系	检测 DNA 图谱或其他方法鉴定细胞系	见 13.1.4 节
错误标记	错误标记培养瓶或冻存管，冻存细胞标记错误，取错冻存管	定期检查所有细胞系；复苏后检查新库存；遵循 14.6 节提及的规则	通过 DNA 图谱或其他方法鉴定细胞系；弃去所有被错误认定的细胞系，更换为已鉴定的冻存细胞	见 13.1 节、13.1.4 节

28.13 冻　存

28.13.1 复苏时存活率低

冻存细胞复苏后的存活率一般为 50%~80%。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
冷冻速度	细胞降温与冷冻速度欠佳	通过改变隔热冻存盒外壁的厚度来改变冻存速度，或使用程控冻存系统	优化程控冻存系统的冻存曲线	见 15.3.4 节
冻存时细胞浓度	细胞漏出，低浓度导致低存活率	提高冻存细胞的浓度（常规浓度为 1×10^6~1×10^7 个/mL）		见 15.3.2 节
复苏时细胞浓度	细胞重新接种时浓度过低	提高冻存细胞的浓度（复苏时细胞密度可为正常接种时的 5 倍以上）；复苏时降低稀释比例（需离心去除保护剂）；把几个冻存管的细胞合并在一起后离心去除保护剂	优化冻存时的细胞浓度，从而达到最大存活率	见 15.3.8 节
复苏后细胞稀释率	快速稀释可导致渗透损伤	向复苏后细胞中缓慢加入培养基	更新操作规程	见 15.3.8 节
冻存剂				
DMSO	源于储藏容器的污染	检查颜色，正常的 DMSO 应为无色；通过分光光度分析与新鲜的 DMSO 进行比较	储存容器及盖子均需玻璃或聚丙烯制成	
	诱导细胞分化	查阅文献以确定此种细胞不会被 DMSO 诱导分化	复苏后离心细胞以去除 DMSO	见 19.7.2 节
甘油	光照可诱导甘油转化为有毒的丙烯醛	将甘油分装为数周内可用完的小体积；避光保存		见 10.6.4 节

28.13.2 冻存后细胞形态发生变化

可参见 28.11 节。

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
标记有误	标签模糊，错误，库存管理问题	检查冻存管标签，如标签难以辨认，弃去这些冻存管；检查冻存记录	检查细胞认证	见 13.1.2 节
与前次细胞培养的条件不同	新的员工、方法、培养皿、培养基或血清类型、批次或供应商	如有可能恢复原始条件；筛选新培养基和血清的批次及塑料培养瓶	为每种细胞系制定标准化培养条件	见 12.5.3 节、12.5.6 节
污染	冻存管发生泄露	检查密闭：盖子应拧紧，且密闭圈不能变形	确认正确的扭力拧紧盖子	见 15.3.5 节、15.3.7 节
	复苏时在水浴中受到污染	不要将冻存管浸没在水中；应置于架子上，使其只有部分被淹没；尝试用气浴加热槽复苏细胞；复苏后仔细擦拭冻存管	确保操作过程中使用的冻存管从未被浸入到液氮中	见 15.3.9 节
	从液氮中受到污染	不要把冻存管淹没在液氮中	使用蒸汽或灌注夹克冰柜存储	见 15.3.6 节

28.13.3 冻存细胞丢失

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
爆炸	液氮浸入冻存管内	使用蒸汽或灌注夹克冰柜存储	更新操作规范和安全规程	见 15.3.9 节
最后的种子储备被移走	储存管理问题	通过分装后的冻存细胞补充；从信誉良好的细胞库补充	检查储备安全控制系统，只有管理人员才可以有权接触种子储备	见 15.4.1 节；表 15.5；补充材料中的附录III：商品化细胞库名录
实验者个人储备耗尽	正常使用	通过分装后的冻存细胞补充		见 15.4.1 节
分装的储备耗尽	正常使用	从种子储备补充	确保种子储备充足	见 15.4.1 节

28.14 细 胞 计 数

28.14.1 用血细胞计数板计数

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
数字波动较大	取样错误	取样前充分混匀细胞悬液；确保样品为单细胞悬液，无团块	修正离散细胞的操作过程	见步骤 23.1；表 12.4
	错误使用血细胞计数板	确保盖玻片正确封盖（盖玻片的边缘可看到干扰色），计数池的载样量不是过多或过少；用于计数的细胞数量充足(>200 个)	修正计数操作过程和培训	见 23.1.1 节、27.3 节练习 11
细胞能见度差	计数池的镀银受损；光学仪器差	使用相差装置或非聚光光线；将细胞染色	更新血细胞计数板盖玻片；为显微镜配备相差装置	

28.14.2 使用阻抗法电子计数仪计数

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
数字波动较大	取样错误	取样前充分混合样品，确保样品为单细胞悬液，无团块	检查胰蛋白酶化和样品采集过程	见 23.1.2 节
计数仪计数循环缓慢或不能启动	小孔堵塞	运行清洗循环或清除堵塞循环程序；用指尖或细刷擦洗电阻抗法计数计的小孔	用洗涤剂浸泡 1~18h 后用重复清除堵塞程序；重复 3 次清洗循环程序	见 23.1.2 节
	负压不足	检查废液收集瓶是否已经充满；检查负压泵（参照说明书中的诊断检测）及其管线连接	如果负压泵不工作，请工程师维修	
计数值低于预期值，或者小孔反复堵塞	悬液中细胞凝集	通过猛烈吹打原始细胞样品使细胞分散，重新稀释后再上样计数；使用不同的抗凝集技术		见表 12.4

续表

问题种类	原因	处理方法	后续工作	相互参考
背景过高	计数探头在烧杯外，或探头连线未接好	将探头放入烧杯中；确保探头稳定；如果探头终板丢失，则需换新探头	确保指示是充分和可见的	见方案21.2
	细胞悬液中有沉淀或污染	准备新鲜的计数液	如仍有问题，则用孔径0.45μm的一次性滤器过滤计数液	
	受到其他设备或光线的干扰	调整消除器；检查地线		

参考文献

Sigma-Aldrich. Antibiotics for mammalian cells culture (table) (www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/antibiotic_application_guide.pdf).

（安 威 译）

第29章

结　　语

我的初衷是在本书前面内容中充分详尽地描述细胞培养基本原理，使读者无需参考其他文献，除非需要将本职工作拓展到基本操作过程之外或获取更多的背景知识细节。作为惯例，在结束一场讲演之前总要进行要点总结，基此，我想概括本书的要点。

成功地重复细胞培养实验需要的一些基本要求，需要强调下列几点。

（1）确保你的指导和对同事的培训都来自于可靠的经验。

（2）在一个整洁、不拥挤、无菌的细胞专用培养室内工作，并在实验后及时清理。

（3）为了避免包括交叉感染在内的污染的传播，不要与他人共用培养基、试剂、细胞及其他物品。

（4）不要因为自己从未见过支原体污染就认为它不会在你的工作中发生；要经常检测你的细胞。

（5）保持详细的实验记录，特别是操作步骤、培养基、试剂等的改变；对你使用的细胞系要保存图片记录。

（6）对于所研究的细胞系，必须确保其来源正规可靠，如从一家国际细胞库获得。除非你能证明细胞系是可靠的，否则不要相信任何细胞系，哪怕是从建立该细胞系的人那里获得的。

（7）熟悉你所用的细胞系，诸如外观形态、生长速率、特殊特征等，这样当细胞发生任何变化时都能立刻作出反应。

（8）确保你的工作不会危及你自身及周围人的安全。

（9）细胞系应置于液氮冷冻罐中保存（但不要淹没在液氮中），并定期更换所用的储存细胞。

（10）保护重要细胞系的种子储备，使用其他储备进行分装。

（11）尽量在精确确定的条件下工作，其中包括最低限度使用未经确定的培养添加物，不要因为一些无关轻重的原因而改变即定操作规程。

（12）细胞培养与微生物培养应绝对彻底分离。

要想把组织细胞培养的全部精髓与奥妙囊括在内，恐怕这本书要写成好几卷，这恰恰偏离了本书的宗旨。而我希望本书能提供足够的信息，用以组建实验室，准备必要的物品进行组织培养，开发鉴定和了解细胞系特征的技术。通过和不同领域专家的合作，书中还包含了可能的细胞培养应用中的一些特殊操作方案。本书可能还存在诸多不足，但在同事和其他实验室的建议和帮助下，本书也许能够更加充分、更加愉快地引导你了解细胞培养实验。

（安　威　译）

附录 I

计算配制及试剂制备

计　　算

要完成本书所述的一些步骤，需要进行大量的简单计算。只在某个方案中使用的特定计算方法可在该方案中找到，下文仅列出一些普通的计算方法。

稀释细胞

要把细胞悬浮液稀释到较低浓度，所需细胞悬浮液的体积可用如下方法计算得到：

$$\frac{\text{所需浓度}}{\text{初始浓度}}\times\text{所需体积}$$

例如，要把浓度为 2.36×10^6 个/mL 的细胞悬液稀释为 50mL 浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液，需要的体积为

$$\frac{5\times10^4}{2.36\times10^6}\times50=1.06\text{（mL）}$$

也就是说，取 1.06mL 原液稀释至 50mL。

细胞群体倍增数

计算有限细胞系群体倍增数（population doubling，PD）的最简单的方法是将细胞液稀释 2 倍后培养。2 的分割率是一次倍增，4 的分割率是两次倍增，8 的分割率是三次倍增，依此类推。倍增数的计算公式如下：

$$\text{PD}=\frac{\ln(N_{终}/N_{始})}{\ln 2}$$

式中，ln 是自然对数；$N_{始}$ 是细胞周期开始时接种的细胞数目；$N_{终}$ 是细胞增殖后达到的数目。

例如，接种 2×10^5 个细胞，要增殖到 3.2×10^6 个细胞，其倍增数是

$$\text{PD}=\frac{\ln(3.2\times10^6/2\times10^5)}{\ln 2}=\frac{\ln 16}{\ln 2}=\frac{2.7726}{0.6931}=4$$

换 算

摄氏温度（摄氏度）换算为华氏温度

$$\frac{摄氏度\times 9}{5}+32$$

华氏温度换算为摄氏温度

$$摄氏温度（摄氏度）=\frac{华氏温度-32}{9}\times 5$$

摩尔浓度

配方中各组分浓度常以克为单位，但这会因盐内结晶水的多少及游离酸或其盐形式的质量而变化。以摩尔（mol/L）为单位的浓度则可避免这些问题：

$$M=\frac{浓度单位（g/L）}{分子量}$$

例如，浓度为2g/L的EDTA的二水合二钠盐的摩尔量为

$$\frac{2}{372.2}=0.005\,373（mol/L）或\ 5.373（mmol/L）\cong 5（mmol/L）$$

相反，浓度单位（g/L）则等于摩尔数乘以分子量：

$$5.373\times 372.2=2.0$$

压强

不同学科有着不同的压强单位。每平方英寸15磅（$15lb/in^2$或psi）=1大气压（1atm）=1bar=760mmHg=30inHg=100千帕（100kPa）=100牛顿/平方米（$100N/m^2$）。

放射性

放射性常用居里（Ci）表示，但是正确的国际单位制（SI）中的单位应为贝可（Becquerel，Bq）。

$$1Ci=3.7\times 10^{10}Bq\ 或\ 37GBq$$

RPM 换算为 *g*

为方便起见，实验室的多数人习惯用离心机的转速来描述离心步骤，但是这只有在使用相同的离心机及转子时才会保持一致。离心最好用*g*来定义，即相对重力的径向加速度。

$$g=1.118\times 10^{-5}\times 半径（从转子中心到离心管中心的长度）\times（r/min）^2$$

例如，离心机转子的旋转速度为 1500r/min，从转轴的中心到离心管内样品深度的中点，即半径为 18cm，

$$g = 1.118\times10^{-5}\times18\times1500^{2} = 452.79 \cong 450$$

试 剂 制 备

这里所列的许多试剂都可通过商业渠道直接购得（参见补充材料中的附录III），而且专用目录常附有配方。此处的详细资料可供参考，也能为那些愿意在实验室自己配制溶液的人士提供帮助。该附录涉及的试剂在本书几个不同的方案中多次出现。仅在一个方案中使用的专门试剂的配方则通常在该方案的材料部分中列出。

注意事项 所指的稀释倍数，如 1∶10 或 1∶100 是指体积之比，代表终体积分别为 10 份或 100 份。

乙酸/甲醇

一份冰醋酸加三份甲醇，每次使用时再重新配制，置于冰浴中。

乙醇，70%，*V*/*V*

乙醇、甲醇或异丙醇均可用作擦拭表面和局部灭菌。异丙醇常用于临床，也可购得商品化的喷罐。

乙醇……700mL
去离子水或反渗透水……300mL

2.5%琼脂

琼脂……2.5g
超纯水……100mL

（1）加热溶解琼脂。
（2）高压灭菌或煮沸 2min。
（3）室温保存。

酰胺黑

见萘黑。

必需氨基酸

参见 8.4.1 节和表 8.3；以 0.1mol/L HCl 配制的 50×浓度的商品在 Life Technologies，MP Biomedical 和 Sigma 公司有售。

（1）如自己配制，50×酪氨酸和色氨酸要以 0.1mol/L HCl 配制；其余氨基酸以超纯水配制成 100×浓度。

（2）稀释后使用（参见方案 10.10）。

（3）过滤除菌。

（4）4℃避光保存。

非必需氨基酸

成分……g/L（100×）
L-丙氨酸……0.89
水合 L-天冬酰胺……1.50
L-天冬氨酸……1.33
甘氨酸……0.75
L-谷氨酸……1.47
L-脯氨酸……1.15
L-丝氨酸……1.05
水……1000mL

（1）过滤除菌。

（2）4℃保存。

（3）稀释 100 倍使用。

抗生素

见下列特定标题（如青霉素、硫酸链霉素、硫酸卡那霉素、庆大霉素、制霉菌素）。

细菌培养用蛋白胨 5%

Difco 公司的细菌培养用蛋白胨……5g
Hanks 平衡盐溶液（BSS）……100mL

（1）搅拌溶解。

（2）分装到可供 1∶50 稀释的试剂瓶中，高压灭菌。

（3）室温保存。

（4）使用时按 1∶10 稀释。

平衡盐溶液（BBS）

（参见表 8.2）

（1）配制时，应先单独溶解每一组分，最后加 $CaCl_2$。

（2）定容到 1L。

（3）调整 pH 至 6.5。

（4）可选用高压或过滤方法灭菌。如选用高压灭菌，平衡盐溶液的 pH 需低于 6.5，以防磷酸钙沉淀；或者，可采用最后添加钙的方法。如果溶液中含有葡萄糖，应采用过滤方式除菌，以避免高压使葡萄糖焦化。也可单独将高浓度葡萄糖（如 20%）溶液高压灭菌（参见本附录中 20% 葡萄糖配制），然后再加到平衡盐溶液中。

（5）高压灭菌时还应在高压前标记液面高度，高压后置室温保存。如果液体蒸发导致液面降低，使用前以高压灭菌的超纯水补齐。如果试剂瓶为硼硅酸玻璃，则高压前可密封瓶子，使液体不再蒸发。

肉汤

（参见厂家产品说明；还可参见细菌蛋白胨。）

高压灭菌。

甘油封固剂

参见支原体。

羧甲基纤维素（CMC）

（1）称取 4g CMC 置于烧杯内。

（2）加 90mL Hanks 平衡盐溶液，煮沸使 CMC 湿润。

（3）溶液冷却至 4℃静置过夜使其变清。

（4）用 Hanks 平衡盐溶液补齐到 10mL。

（5）高压灭菌，此时 CMC 呈固化状，但在 4℃会再度溶解。

（6）使用时（如用于增加悬浮培养时培养基的黏度），每 100mL 培养基加 3mL CMC。

鸡胚提取物（Paul，1975）

（1）从鸡蛋中取出鸡胚（参见方案 11.2），置于 9cm 有盖培养皿中。

（2）用两把灭菌的手术镊取出鸡胚的双眼。

（3）将鸡胚移至 50mL 平底（或圆底）容器中，每个容器放 2 个鸡胚。

（4）每一容器中加等体积 Hanks 平衡盐溶液。

（5）取一根灭菌的玻璃棒，将玻璃棒经加热后变平的一端插入容器中，捣碎胚胎。

（6）室温静置 30min。

（7）2000*g* 离心 15min。

（8）弃去上清，取样检测胚胎无细菌污染后（参见 10.6.2 节），分装，快速冻融 2 次，置于 −20℃保存。

鸡胚和其他组织的提取物还可使用 Potter 匀浆器或 Waring 搅拌器匀浆后制备（Coon and Cahn，1966）。

（1）将切碎的鸡胚与等体积的 Hanks 平衡盐溶液混合，匀浆。

（2）将匀浆液移入离心管，1000*g* 离心 10min。

（3）将上清移至另一离心管中，再离心 10 000*g*，20min。

（4）取样检验是否无菌（参见 10.6.2 节）。

（5）分装。

（6）快速冻融两次，保存于－20℃。

柠檬酸/结晶紫

参见结晶紫。

CMC

见羧甲基纤维素。

秋水仙酰胺（100×）

秋水仙酰胺 …… 100mg

Hanks 平衡盐溶液 …… 100mL

（1）搅拌溶解。

（2）过滤除菌。

（3）分装后－20℃保存。

▲安全提示 秋水仙酰胺具有毒性，处理时应在通风橱中戴手套称取。

胶原酶

Worthington 公司 CLS 级胶原酶或其他公司相当单位胶原酶（酶活性为 1500~2000U/mg），在 Hanks 平衡盐溶液中，使用浓度为 2000U/mL。

胶原酶 …… 100 000 单位

Hanks 平衡盐溶液 …… 50mL

（1）37℃搅拌 2h 或 4℃过夜搅拌，令其溶解。

（2）过滤除菌步骤同血清（参见方案 10.10，方案 10.16-Su）。

（3）分装，每一包装可供 1~2 周使用。

（4）－20℃保存。

胶原酶-胰蛋白酶-鸡血清（CTC）（Coon and Cahn，1966）

无菌	所需体积	终浓度
无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 盐液（Moscona，1952）	85mL	
胰蛋白酶储存液（2.5%，灭菌）	4mL	0.1%
胶原酶储存液（1%，灭菌）	10mL	0.1%

鸡血清……………………………………………………………1mL 1.0%

分装后－20℃保存。

组织活检用培养基

生长培养基，如L-15（Leibovitz，1963）……………………………………500mL

青霉素……………………………………………………………………125 000单位

链霉素……………………………………………………………………125mg

卡那霉素…………………………………………………………………50mg

或

庆大霉素…………………………………………………………………25mg

两性霉素…………………………………………………………………1.25mg

4℃保存最长可达3周，在–20℃保存时间更长。

0.1mol/L柠檬酸中的0.1%结晶紫

柠檬酸……………………………………………………………………21.0g

结晶紫……………………………………………………………………1.0g

（1）加去离子水至1000mL。

（2）搅拌溶解。

（3）以Whatman 1号滤纸过滤去除杂质。

结晶紫水溶液（0.1%）

结晶紫……………………………………………………………………100mg

水…………………………………………………………………………100mL

使用前用Whatman 1号滤纸过滤。

（也可以从Merck公司购买配制好的0.1%的结晶紫）

地塞米松（Merck Millipore; Sigma-Aldrich）

1mg/mL

本品为无菌玻璃瓶包装。

（1）用注射器向玻璃瓶中注入5mL无菌水溶解地塞米松。

（2）溶解后用注射器将溶液吸出。

（3）稀释至1mg/mL，约相当于2.5mmol/L浓度。

（4）分装后－20℃保存。

（5）使用时可相应稀释，比如生理浓度10~50nmol/L；药理浓度0.1~1.0μmol/L；大剂量时可用到25~100μmol/L。

解剖用平衡盐溶液（DBSS）

（1）对不含碳酸盐的 Hanks 平衡盐溶液，先行高压灭菌，然后加入如下组分（全部无菌）：

青霉素……250U/mL

链霉素……250μg/mL

卡那霉素……100μg/mL

或

庆大霉素……50μg/mL

两性霉素 B……2.5μg/mL

（2）−20℃保存。

D-PBSA

参见磷酸盐缓冲液。

无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 Dulbecco's PBS（D-PBSA）

（参见方案 10.6）

EDTA（弗深 Versene）

（1）配制 10mmol/L 浓度：取 0.374g EDTA，加 1L D-PBSA 溶解。

（2）高压灭菌或过滤除菌。

（3）当需要用浓度为 1.0mmol/L 和 2.0mmol/L 时，用 D-PBSA 或含有胰蛋白酶的 D-PBSA 按 1∶10 和 1∶5 稀释；少数情况下，如果需要高浓度（5mmol/L）则按 1∶2 稀释。

EGTA

配制与 EDTA 相同，由于 EGTA 毒性低，故使用浓度可高于 EDTA。

聚蔗糖（Ficoll）20%

（1）将 20g Ficoll（GE Life Sciences 公司）缓慢铺撒到 80mL 超纯水上层。

（2）过夜沉降使其溶解。

（3）用超纯水补齐到 100mL。

（4）高压灭菌。

（5）室温保存。

可从公司购买同时含有甲泛影酸钠的 Ficoll 用于淋巴细胞的分离（参见补充材料中附录Ⅲ：Ficoll-甲泛影酸钠）。

组织培养用固定液

见乙酸/甲醇。

还可使用无水乙醇或甲醇（参见方案18.2）、10%福尔马林、1%戊二醛或5%多聚甲醛作为固定液。

明胶

（出自方案25.17-Su；亦可参见本附录中的“载玻片涂层”）

（1）用超高压水溶解明胶（Sigma-Aldrich）制成1%的储存液。

（2）121℃高压灭菌20min。

（3）分装后－20℃保存。

（4）要制备0.1%的工作液，则将1%的明胶储存液在37℃加热融化，再用D-PBSA按1∶10稀释。

庆大霉素

储存液为50mg/mL（参见补充材料中的附录III）；稀释至50μg/mL使用。

格氏平衡盐溶液

NaCl	7.00g
KCl	0.37g
$CaCl_2$	0.17g
$MgCl_2\cdot 6H_2O$	0.21g
$MgSO_4\cdot 7H_2O$	0.07g
$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$	0.30g
KH_2PO_4	0.03g
$NaHCO_3$	2.27g
葡萄糖	1.00g
加水至	1000mL
CO_2	5%

吉姆萨（Giemsa）染色

Giemsa染色可先用原液，然后用缓冲液或水稀释（参见方案18.2），或者在使用之前用缓冲液稀释。本书作者认为第一种方法更适用于培养的细胞。

（1）缓冲液

$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$	0.01mol/L	1.38g/L
$Na_2HPO_4\cdot 7H_2O$	0.01mol/L	2.68g/L

二者以适当比例混合，使 pH 达到 6.5。

（2）用此缓冲液按 1∶10 比例稀释 Giemsa 浓缩液（Sigma-Aldrich）至 100mL。

（3）用 Whatman 1 号滤纸过滤。

（4）因 Giemsa 原液常出现沉淀，因此建议在使用前临时制备稀释液。

葡萄糖 20%

葡萄糖……………………………………………………………………20g

Hanks 平衡盐溶液加至………………………………………………100mL

（1）高压灭菌。

（2）室温保存。

谷氨酰胺，200mmol/L

L-谷氨酰胺…………………………………………………………29.2g

Hanks 平衡盐溶液……………………………………………………1000mL

（1）谷氨酰胺溶解于平衡盐溶液后（参见方案 10.12、方案 10.13），过滤除菌。

（2）分装后−20℃保存。

谷胱甘肽

（1）以 HBSS 或 D-PBSA 配制 100×储存液（浓度为 0.1mol/L）。

（2）过滤除菌。

（3）分装后−20℃保存。

（4）稀释到 1mmol/L 使用。

Ham's F12 培养基

（参见表 8.3）

Hanks 平衡盐溶液

（参见 8.3 节、表 8.3 和本附录 BSS 的配制。）

无酚红的 Hanks 平衡盐溶液

略去酚红，其余同前（参见表 8.2）。

HAT 培养基

药品	浓度	溶剂	终浓度（100×）
次黄嘌呤（H）	136mg/100mL	0.05mol/L HCl	1×10^{-2}mol/L
氨基蝶呤（A）	1.76mg/100mL	0.1mol/L NaOH	4×10^{-5}mol/L
胸苷（T）	38.7mg/100mL	HBSS	1.6×10^{-3}mol/L

（1）使用 HAT 选择培养基时，取三等份（H，A，T）混合，过滤除菌，按终浓度 3%（*V/V*）加至培养基中。

（2）H 和 T 可置 4℃保存，而 A 则需置于-20℃保存。

HB 培养基

将下列成分依次加入 CMRL1066 培养基中：

成分	浓度
胰岛素	5μg/mL
氢化可的松	0.36μg/mL
乙酸视黄酯	0.1μg/mL
谷氨酰胺	1.17mmol/L
青霉素	50U/mL
链霉素	50μg/mL
庆大霉素	50μg/mL
真菌阻（Fungizone）*	1.0μg/mL
胎牛血清	1%

HBSS

见 8.3 节、表 8.3 和本附录的 BSS 配制。

Hoechst 33258（Chen，1997）

2-［2-（4-间苯二酚）-6-苯并咪唑］-6-（1-甲基-4-哌嗪）苯并咪唑三盐酸化物

（1）以不含酚红的 D-PBSA 或 HBSS 配成 1mg/mL 的储存液。

（2）－20℃保存，使用时以不含酚红的 pH 7.0 的 D-PBSA 或 HBSS 稀释 20 000 倍（即 1.0μL 稀释至 20mL）。

▲安全提示 由于 Hoechst 33258 可能致癌，操作时应特别小心，称取需在通风橱内，并戴手套。

Holtfreter's 缓冲液

成分	用量
NaCl	70g

* 真菌阻是施贵宝（Squibb）制药公司的两性霉素 B 的商品名，译者注。

KCl ………………………………………………………… 1.0g
$NaHCO_3$ ………………………………………………… 4.0g
$CaCl_2$ …………………………………………………… 2.0g
加超纯水至 …………………………………………… 1000mL

（1）过滤除菌
（2）4℃保存。
（3）使用时用灭菌的超纯水按照 1∶20 的比例稀释。

硫酸卡那霉素（Sigma-Aldrich），10mg/mL

卡那霉素 ………………………………………… 4 支 1g 包装
Hanks 平衡盐溶液 ………………………………………… 400mL

（1）从 400mL HBSS 中取出 5mL 注入每支卡那霉素安瓿瓶中。
（2）静置数分钟溶解。
（3）用注射器取出，注回 400mL HBSS 瓶中。
（4）再加 5mL HBSS 冲刷卡那霉素瓶，注回 400mL 瓶中。充分混匀。
（5）分装到 20mL 无菌试剂瓶，－20℃保存。
（6）无菌检测：按 2mL 卡那霉素与 10mL 培养基（无任何抗生素）混合，37℃，培养 72h。
（7）使用浓度为 100μg/mL。

乳白蛋白水解液 5%（10×）

乳白蛋白水解产物 ………………………………………… 5g
HBSS ………………………………………………………… 100mL

（1）加热溶解。
（2）高压灭菌。
（3）使用时稀释 10 倍（0.5%）。

McIlvaines 缓冲液，pH 5.5

	储存液的摩尔浓度	储存液的质量浓度	配制 20mL	配制 100mL
Na_2HPO_4	0.2mol/L	28.4g/L	11.37mL	56.85mL
柠檬酸	0.1mol/L	21.0g/L	8.63mL	43.15mL

培养基

一些常用培养基的配方在本书第 8 章和第 9 章已有详述（参见 8.4 节，表 8.3、表 9.1 和表 9.2），并附有制备的推荐的步骤（亦见 UCSF Cell Culture Facility）或供应商的产品目录（参见补充材料中的附录Ⅲ：培养基）。

MEM

见本附录，培养基。

β-巯基乙醇

储存液（Sigma-Aldrich）浓度为5mmol/L …… 4μL
HBSS …… 10mL
（1）在通风橱内过滤除菌。
（2）−20℃保存，或现用现配。

Methocel（甲基纤维素商品名）

参见甲基纤维素。

甲基纤维素（1.8%）

（1）称取7.2g甲基纤维素（Dow），倒入放有一个大磁力搅棒的500mL试剂瓶内。
（2）高压灭菌，注意高压前放松瓶盖，以利于蒸汽流通。
（3）灭菌后，加400mL预热至90℃的无菌水，以浸湿甲基纤维素。
（4）磁力搅拌下4℃过夜溶解（如不持续搅拌，甲基纤维素会呈胶状）。

上述方法配制的甲基纤维浓度为2×，使用时以相同体积的2×培养基稀释，培养基种类可任选。使用注射器（无针头）分配甲基纤维素，要比移液管更精确。

（5）应用时将少量甲基纤维素加至悬浮培养基中（参见方案16.5）。

丝裂霉素C

储存液，10μg/mL（50×）
丝裂霉素C（Sigma-Aldrich）为2mg包装。
（1）量出20mL HBSS，加入灭菌的试剂瓶。
（2）用注射器取出2mL HBSS，加到丝裂霉素包装瓶中，
（3）待混合物溶解后，取出，注回20mL HBSS试剂瓶中。
（4）4℃避光保存的期限为1周（用铝箔纸包裹）。
（5）如需长期保存，应放置于−20℃。
（6）如处理18h则稀释到0.25μg/mL，如处理10h则使用20μg/mL（参见方案16.3和方案25.4-Su）。

▲安全提示 丝裂霉素具有毒性，应在原包装瓶内溶解。操作该物质粉末时应在通风橱内进行。

MTT

（1）将3-（4,5-二甲基噻唑-2）-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT，Sigma-Aldrich）溶于D-PBSA，

配制成 50mg/mL。

（2）过滤除菌。

▲安全提示 MTT 具有毒性，应在通风橱内称取，并戴手套。

支原体试剂

染料（参见 Hoechst 33258）。

封片剂：含甘油的 McIlvaines 缓冲液 pH 5.5。

			配制 40mL
Na_2HPO_4（56.8g/L）	0.4mol/L	56.8g/L	11.37mL
柠檬酸（42.0g/L）	0.2mol/L	42.0g/L	8.63mL
甘油			20mL

（1）加入 Vectashield（Vector 公司）以降低荧光淬灭（参见产品说明书）。

（2）检查 pH 并调至 5.5。

制霉菌素（Nystatin）

配制 2mg/mL（100×）：

制霉菌素（Sigma-Aldrich）…… 200mg

Hanks'BSS …… 100mL

（1）配制方法同卡那霉素（参见本附录前述）。

（2）终浓度为 20μg/mL。

N2 补充液

[参见方案 26.1-Su、Nichols 和 Yang（2006）]

储存液

胰岛素（Sigma-Aldrich）：浓度 25mg/mL，用过滤除菌的 0.01mol/L HCl 4℃过夜溶解。

脱铁转铁蛋白（Sigma-Aldrich）：浓度 100mg/mL，用过滤除菌的水溶解。

牛白蛋白组分 V 溶液（ Life Technologies，见产品说明书）。

孕酮（Sigma-Aldrich）：浓度 0.6mg/mL，溶于乙醇，过滤除菌。

腐胺（Sigma-Aldrich）：浓度 160mg/mL，溶于水，过滤除菌。

亚硒酸钠（Sigma-Aldrich）：浓度 3mmol/L，溶于水，过滤除菌。

DMEM：F12（Life Technologies）。

除了 DMEM：F12（4℃保存）、其余储存液分装后－20℃保存。

配制 40mL N2 补充液则按以下用量加入储存液

DMEM：F12 …… 27.5mL

牛白蛋白组分 V（Sigma-Aldrich）溶液 …… 4mL

胰岛素（Sigma-Aldrich） …… 4mL

（为了防止沉淀，应分次加入，每次 200μL）

脱铁转铁蛋白（Sigma-Aldrich）······4mL
亚硒酸钠（Sigma-Aldrich）······40μL
腐胺（Sigma-Aldrich）······400μL
孕酮（Sigma-Aldrich）······132μL
分装后置于−20℃，可保存3周。

N2B27无血清培养基

[参见方案26.1、Nichols和Yang（2006）]

DMEM：F12（Life Technologies）1：1混合，加入2mmol/L L-谷氨酰胺，并补充加入神经培养基（Life Technologies）、β-巯基乙醇（0.1mmol/L），B27补充液（Life Technologies）按1：100稀释，N2补充液（1：200稀释，见本附录前述）。

N2B27成品可从干细胞科技公司购得（www.stemcellsciences.com）。

萘蓝黑

用Hanks平衡盐溶液配制成1%溶液。
萘蓝黑······1g
Hanks' BSS······100mL

（1）尽可能使染料溶解于HBSS。

（2）将饱和溶液用Whatman 1号滤纸过滤。

PBS

见磷酸缓冲盐溶液（S代表Saline，是盐溶液，代表等渗，磷酸缓冲液是PB，是不等渗的）。

PE

见磷酸缓冲盐溶液/EDTA。

Percoll

（1）商品化的Percoll是无菌的，使用时用培养基或HBSS稀释到所需密度（参见补充材料中的附录Ⅲ：密度表）。

（2）调整渗透压。如果将溶液调到290mOsm/kg需要高渗或低渗的稀释液。因此，最好取少量样品稀释，待得到正确的渗透压后，再按相应比例稀释其余的Percoll。

磷酸缓冲盐溶液（Dulbecco溶液A；D-PBSA）

（表8.2和方案10.6）

磷酸缓冲盐溶液/EDTA，10mmol/L（PE）

（1）先配制 D-PBSA。

（2）加入 EDTA 3.72g/L，搅拌。

（3）分装，高压灭菌，室温保存。

（4）大多数情况下 PE 的使用浓度为 1mmol/L，即使用时用 D-PBSA/EDTA，按 1∶10 稀释；当需要螯合大量离子时，浓度应提升到 5mmol/L，即按 1∶2 稀释（如胰蛋白酶消化 CaCo-2 细胞）。

植物血细胞凝集素（PHA，Sigma-Aldrich）

（1）用注射器将 HBSS 注射到安瓿瓶中溶解冻干的植物血细胞凝集素，配成 500μg/mL（100×）储存液。

（2）分装后−20℃保存。

（3）使用时按照 1∶100 稀释。

SF12

Ham's F12（表 8.3）内含 2× Eagle's MEM 必需氨基酸和 1×非必需氨基酸，无胸苷，含 10×浓度的叶酸。

碳酸氢钠

用超纯水配成 7.5%（*w*/*V*）的碳酸氢钠溶液。分装成 50mL 的包装后于 121℃高压灭菌 10min 或过滤除菌。通常在用于含 CO_2 的环境时，每 100mL 培养基加入 3mL 碳酸氢钠，在用于气相或空气环境时，每 100mL 培养基加入 0.45mL 碳酸氢钠（参见 8.2.2 节）。实际需要加入到培养基的碳酸氢钠的量取决于培养基的初始 pH，亦应该在加入不同量的碳酸氢钠后，将培养基置于 37℃孵育后检测其 pH，以此调节用量（参见 10.4.4 节）。

SSC（柠檬酸钠/氯化钠）

（1）配制浓缩的 20×SSC

柠檬酸三钠（$2H_2O$），0.3mol/L ……………… 88.3g

NaCl，3.0mol/L ……………… 175.3g

加水至 ……………… 1000mL

（2）用时稀释到 1×或 2×。

显微镜载物片的涂层溶液

明胶（终浓度 0.1%）、铬矾（硫酸铬钾，终浓度 0.01%）溶于双蒸水或反向渗透水（RO）（Kiernan，1999）。

胰蛋白酶

在 0.85%（0.14mol/L）的 NaCl 中浓度为 2.5%（*w*/*V*）。

配制 2.5%的储存液：

胰蛋白酶（如 Difco 1∶250）……25g
0.85%的 NaCl……1L

（1）室温搅拌 1h 或 4℃搅拌 10h。如果胰蛋白酶溶解不彻底，可用 Whatman 1 号滤纸过滤澄清。
（2）过滤除菌。
（3）分装为 10~20mL，－20℃保存。
（4）使用时，融化后用 D-PBSA 或 PE 按 1∶10 稀释。
（5）稀释后的胰蛋白酶在 4℃时最长可保存 3 周。

注意事项 购得的胰蛋白酶有粗制品（Difco 公司）和精制品（Worthington 和 Sigma 公司，3×重结晶）之分。粗制品胰蛋白酶中可能含有其他蛋白酶，有助于消化细胞，但可能会对敏感的细胞有害。通常实践中都使用粗制品胰蛋白酶。只有当观察到细胞存活率减少、生长减缓时，才会使用精制品。精制品酶活性相对较高，故使用浓度可相应降低（如 0.01%或 0.05%）。商品化的胰蛋白酶的活性与供应商和批次都有关，因此需要在购买时检查其活性。酶活性越高，所需浓度越低。传统意义的酶活性为 1∶250，也就是每毫克 250USP 单位，1∶250 活性的胰蛋白酶相当于每毫克 750BAEE 单位。配制胰蛋白的酶粗制品时，应检测是否有支原体污染。

胰蛋白酶/EDTA

参见胰蛋白酶，步骤 4

胰蛋白酶，弗深（Versene），磷酸盐（TVP）

胰蛋白酶（Difco 1∶250）……25mg（或 1mL 2.5%）
磷酸缓冲盐溶液（PBS），D-PBSA……98mL
EDTA 二钠（$2H_2O$）……37mg
鸡血清（MP Biomedicals）……1mL

（1）将 D-PBSA 和 EDTA（即弗深）混合，高压灭菌，室温保存。
（2）鸡血清和胰蛋白酶可现用现加，如果加入的胰蛋白酶为粉剂，则必须先过滤后再加入血清。
（3）分装后－20℃保存。

台氏液

NaCl……8.00g
KCl……0.20g
$CaCl_2$……0.20g
$Mg_2Cl_2 \cdot 6H_2O$……0.10g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$……0.05g
葡萄糖……1.00g

加超纯水至 …………………………………………………………………………………… 1L
气相 ………………………………………………………………………………………… 空气

弗深（Versene）

见 EDTA。

存活率检测染料

见萘蓝黑。
大部分组织培养基供应商可提供台盼蓝（参见补充材料中的附录III）。

维生素

详细的描述见培养基配方（表 8.3、表 9.1、表 9.2），商品化的浓度为 100×。
（1）每种维生素配成 1000~10 000×浓度储存液，根据需要混合在一起形成 100×浓缩液。
（2）过滤除菌。
（3）−20℃避光保存。

参考文献

Chen TR (1977). *In situ* detection of mycoplasm contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.* **104**:255.

Coon HG, Cahn RD (1966). Differentiation *in vitro*: Effects of Sephadex fractions of chick embryo extract. *Science* **153**:1116–1119.

Coon HG, Cahn RD (1966). Differentiation *in vitro*: Effects of Sephadex fractions of chick embryo extract. *Science* **153**:1116–1119.

Kiernan JA (1999). Strategies for preventing detachment of sections from glass slides. *Microsc. Today* **6**:22–24.

Leibovitz A (1963). The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.* **78**:173–183.

Moscona AA (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* **3**:535.

Nichols J, Ying QL (2006). Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum- and feeder-free culture. *Methods Mol. Biol.* **329**:91–98.

Paul J (1975). *Cell and tissue culture*. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 172–184.

UCSF Cell Culture Facility. *Media formulations and FBS* (www.ccf.ucsf.edu/Protocols/ccfMediaFBS.asp).

补　　充

Supplier	URL
BD Biosciences	www.bdbiosciences.com/
Dow Chemical Company	www.dow.com/
GE Life Sciences	www.gelifesciences.com/
Life Technologies	www.thermofisher.com
Merck Millipore	www.merckmillipore.com
EMD Millipore	www.emdmillipore.com/
Millipore	See Merck Millipore or EMD Millipore
MP Biomedicals	www.mpbio.com/
Sigma-Aldrich	www.sigmaaldrich.com/
Stem Cells Sciences	www.stemcellsciences.com
Vector Laboratories	www.vectorlabs.com/
Worthington	www.worthington-biochem.com/

附录II

术　　语

据 Schaeffer（1990）修改

Adaptation（**适应**）：对某种刺激（如酶适应）的反应而产生的大分子物质（通常是蛋白质）合成的诱导或抑制作用——诱导剂或抑制剂引起的酶活性的改变，包括酶合成率或降解率的改变。

Allograft（**同种异体移植**）：见同种移植（homograft）。

Amniocentesis（**羊水诊断**）：出生前羊膜腔取样。

Amplicon（**扩增子**）（**扩增产物**）：由聚合酶链反应（PCR）产生的扩增产物。该 DNA 区通常比较小（100~200 个碱基），拷贝数要比基因组 DNA 高几个数量级。

Anchorage dependent（**锚定依赖**）：需要贴附到固体基质上以存活或生长。

Anemometer（**风速计**）：测定空气流动速度的仪器。

Aneuploid（**非整倍体**）：染色体数为非整倍数，见单倍体。

Apoptosis（**凋亡**）：一种由生物学控制的，涉及 DNA 断裂和核破裂的细胞内程序性死亡。

Aseptic（**无菌**）：没有微生物污染。

Authentication（**认证**）：确定一个细胞系或细胞株的独特特征的一个或多个过程。

Autocrine（**自分泌**）：一个细胞对自身产生的因子发生的受体介导反应。

Autograft（**自体移植**）：取自一个个体的移植物移植回同一个个体。

Autoradiography（**放射自显影**）：用放射性同位素在细胞、组织切片和电泳制备物的斑点上定位，通过紧贴标本的显影乳胶曝光获得结果。

Balanced salt solution（**平衡盐溶液**）：一种等渗溶液，接近正确的生理浓度；也可以含有葡萄糖，但通常不含其他有机营养物。

Bioreactor（**生物反应器**）：大规模生产细胞的培养容器，培养的细胞可锚定在基质上或悬浮生长。

Biostat（**生物稳定性**）：培养容器中，物理、生化和生理条件及细胞浓度都保持在稳定状态，通常是通过灌注、监测和反馈来维持这种稳定状态。

Carcinoma（**癌**）：来源于上皮细胞，通常都为内胚层或外胚层来源的肿瘤细胞。

Cell concentration（**细胞浓度**）：每毫升培养基中的细胞数。

Cell culture（**细胞培养**）：通过自发迁移或机械的、酶解的方式从母体组织分离出来的细胞的生长。

Cell density（**细胞密度**）：每平方厘米基质上的细胞数。

Cell fusion（**细胞融合**）：通过两个细胞的融合形成一个单个的细胞体，这种融合可以是自发的，更常用的方法是用灭活的仙台病毒或聚乙烯乙二醇诱导融合。

Cell hybridization（**细胞杂交**）：见杂合体细胞。

Cell line（**细胞系**）：第一次次代培养后的增殖培养物。

Cell strain（**细胞株**）：通过选择或克隆得到的具有一定特征的细胞系。

Centipoise（**厘泊**）：黏度单位：1000 厘泊等于 1Pa·s。

Centromere（**着丝粒**）：一个染色体内两个染色单体之间的附着点，在细胞分裂的中期、末期与后期与纺锤体相连。

Chemically defined（**化学限定**）：完全由纯的、明确的限定成分制成（指培养基），与“无血清”培养基不同，无血清培养基中可以加入其他很少的特性成分取代血清。

Chromatid（**染色单体**）：通过着丝粒连接成对，并构成一个染色体。

Chromsome（**染色体**）：是在细胞内具有确定形态学结构的 DNA 和核蛋白的复合物，在细胞分裂中期可以见到，由两个形态相同的染色单体通过着丝粒连接构成，在每个物种中含有一定的数目。

Chromosome painting（**染色体着色**）：使用特定的荧光探针来对染色体的特定区域染色。

Clone（**克隆**）：来源于一个细胞的细胞群体。

Commitent（**定向**）：从干细胞发育成特定细胞系的不可逆过程，该过程赋予细胞表达限定特征性机制的能力。

Confluent（**汇合**）：单层细胞中，所有的细胞都同它们周围的所有其他细胞接触，未余留任何未被细胞覆盖的表面。

Constitutive（**原生性物质**）：在无外源调节的情况下细胞表达的物质。

Contact inhibition（**接触抑制**）：像汇合培养那样，当细胞与毗邻的细胞完全接触时，对质膜起皱和细胞运动性的抑制作用常常在细胞增殖停止之前发生，但不一定与之有因果关系。

Continuous cell line or cell strain（**连续细胞系或细胞株**）：具有无限生存下去的细胞系或细胞株。以前被称为“已建立的系”，经常被指作“永生化”。

Construct（**重构**）：指将外源的基因元件通过基因重组到质粒或其他载体，从而将基因转移到受体细胞中。也可以指在组织工程的器官型培养中重构的细胞元件。

Crisis，or “culture crisis”（**危机或“培养危机”**）：在细胞培养中，由基因组不稳定性引起的细胞死亡从而导致的生长停止。

Cyclic growth（**周期性生长**）：在规则的次代培养时间间隔中，从低细胞密度生长为高细胞密度；出于维持的目的，定期重复这一生长周期。

Cytokine（**细胞因子**）：一种由细胞释放的因子，可以诱导受体介导的反应，使其他细胞增殖、分化或发生炎症，通常是一种近距离旁分泌的而非全身性的作用。

Cytostasis（**细胞静息**）：细胞增殖出现中止的状态。

Cytotoxicity（**细胞毒性**）：对细胞内一个或多个代谢通路、细胞内过程或结构造成损伤，并导致细胞功能的损害，通常但不是必然与细胞活力的降低相关。

Deadaptation（**去适应**）：由于缺乏适当（并不总是很明确）的诱导剂而产生的一种特异的可逆性丢失。

Dedifferentiation（**去分化**）：非可逆性的、细胞可能在体内表达的分化特性的丢失。随着证

据的积累，即选择非分化基质细胞，以及因缺乏适当的诱导剂而发生的去适应的联合作用就会引起培养物的去分化。这个术语虽逐渐不受人们的喜欢，但该词仍然能恰当地用来说明组织学观察（如肿瘤组织等）中分化形态的进行性丢失。

Density limitation of growth（**生长的密度限制**）：与汇合状态的细胞密度增加有关的有丝分裂的抑制。

Differentiation（**分化**）：指获得与体内完整功能细胞相关的表型。

Diploid（**二倍体**）：每条染色体都成对出现，常染色体与雌性性染色体一样，而雄性性染色体不同，这与细胞来源物种的大多数体细胞的染色体数目和形态相对应。

Dome（**穹隆**）：汇合的上皮单层中半囊状或水癌样的结构，意指跨过单层的离子通道，导致单层下水的积聚。

DNA barcoding DNA（**条形码分析**）：分析线粒体 DNA 的多态性。

DNA fingerprinting DNA（**指纹图谱**）：将多基因座的 cDNA 探针与通过限制性内切核酸酶剪切的卫星 DNA 高可变区结合，然后通过放射自显影技术观察。DNA 因其物种和个体的变化而出现不同的特定图型。

DNA profiling DNA（**剖析**）：遗传学术语，原用来测定卫星 DNA 高变区。现主要用以单基因座的 RT-PCR 检测小卫星 DNA 中短串联重复序列（CSTR）的频率。其比多基因座 DNA 指纹图更敏感且更容易进行定量分析。

Ectoderm（**外胚层**）：胚胎外侧的胚细胞层，可发育成皮肤上皮组织。

Embryonic induction（**胚胎诱导**）：来自两个不同胚层的细胞间相互作用（一般是交互的），可促进分化。

Embryonic stem cell（**胚胎干细胞**）：是从早期胚胎内细胞群中分离出来的全能干细胞，可以增殖成为细胞系并拥有广泛的分化能力。

Endocrine（**内分泌**）：由一种组织释放的信号因子，如激素等，通过全身的脉管系统作用于远处的组织。

Endoderm（**内胚层**）：胚胎最内侧的胚细胞层，可发育成肠道、肝和肺等器官的上皮成分。

Endothelium（**内皮**）：衬在中胚层来源的组织（如血管）空腔内壁的上皮样细胞，来源于胚胎中胚层。

Enzyme induction（**酶诱导**）：通过刺激，如激素刺激，导致酶合成增加。

Epithelial（**上皮细胞**）：来源于外胚层的细胞，通常不是很严格地用于描述任何多角形的、细胞之间有清楚明确分界限的细胞。严格地说，后者应多指上皮样的或类上皮的细胞。

Epithelium（**上皮层**）：表层的或内表面的细胞，就像在皮肤的表面或肠道的内表面，通常来源于胚胎内胚层或外胚层，但有时也来源于中胚层，如肾小管和体腔内壁的间皮组织。

ES cell（**ES 细胞**）：见胚胎干细胞。

Euploid（**整倍体**）：正好是单倍体染色体组的整数倍。细胞来源的这些物种中，每对染色体的形态学特征描述起来应是十分明确的，但通常并不完全如此，为此，我们似乎应该说“伴有一些染色体畸变的整倍体”。

Explant（**外植体**）：从最初的位置转移出来并在人工培养基中维持生存的组织片段。

Explantation（**外植块培养**）：将组织分离成小块在体外进行培养，严格地（说是）使小块组织伴随着有细胞外长（**见原代外植物培养**），但通常是作为将组织分离而进行培养的通用术语。

FACS：见荧光激活的细胞分选器（fluorescence-activated cell sorter，FACS）。

Fermentor（**发酵罐**）：大规模培养容器，一般用于悬浮细胞的培养，来自用于细菌培养的同

一个名词。

Fibroblast（**成纤维细胞**）：成熟分化纤维细胞的、具有增殖活性的前体细胞。

Fibroblastic（**成纤维细胞的**）：类似于成纤维细胞，即纺锤形（两极的）或星形（多极的）；如果存在接触抑制，通常在汇合时呈平行排列。一般而言，如果不考虑它们与纤维细胞谱系的关系，这个词用起来与未分化中胚层细胞没有区别，意指一类迁移型的细胞或突起长度超过细胞核直径3倍以上的细胞。更确切地说，是指与成纤维细胞类似的或成纤维细胞样细胞。

Ficoll-paque（**菲可-帕克**）：由 Ficoll（一种亲水性多糖）和不透放射线的碘物质（如甲泛影钠）（GE Healthcare Life Sciences）组成的密度介质。

Finite cell line（**有限细胞系**）：通过次代培养繁殖的培养物，但于死亡之前在体外只能传限定的细胞代数。

FISH：见荧光原位杂交。

Flow cytometer（**流式细胞仪**）：通过激光或不同波长的多种激光扫描单个细胞流而记录细胞散射的光或发出的荧光，对细胞群中单个细胞成分进行定量和定性分析的仪器。

Fluorescence-activated cell sorter［**(FACS) 荧光激活的细胞分选仪**］（另见流式细胞仪 Flow cytometer）：一种细胞分离装置，其作用机理是，用激光扫描单细胞流显示单个的细胞散射光或荧光特性，通过这种方法对单细胞悬液进行电磁分选。

Fluorescence *in situ* hybridization［**(FISH) 荧光原位杂交**］：通过原位杂交的技术将特定荧光探针结合在特定的细胞内区域的方法。

Generation number（**世代数**）：培养物自从外植后所经过的群体倍增次数（由次代培养物稀释法估计），必须包括原代培养传代数的估计值。

Generation time（**世代时间**）：从细胞分裂周期中的某一点到下一个分裂周期相同点的时间间隔；与群体倍增时间不同，群体倍增时间源自一个群体中总的细胞计数，因此均衡了不同的世代时间，包括非生长性细胞的影响。

Genotype（**基因型**）：一个细胞总的遗传特征。

Glycocalyx［**多糖-蛋白质复合物（糖萼）**］：附着在细胞表面的糖基化肽、蛋白质、脂质和黏多糖。

Growth curve（**生长曲线**）：以对数刻度表示细胞数，对以线性刻度表示的时间作半对数图，表示培养细胞的增殖；通常分成迟滞期（生长开始之前的阶段）、对数期（指数生长阶段）和平台期（在一个高细胞密度培养物停止生长时得到的稳定的细胞计数）。

Growth cycle（**生长周期**）：从次代培养到可准备进行下一个次代培养的对数期顶端的生长间隔。

Growth factor（**生长因子**）：一种细胞释放的因子，可诱导其他细胞增殖。主要通过旁分泌起作用，也可由血小板或内皮释放到血液中。

Growth medium（**生长培养基**）：用来繁殖特殊细胞系的培养基通常是基础培养基添加其他成分，如血清或生长因子。

Haploid（**单倍体**）：染色体数量，其中每条染色体只被描述一次；在最高级动物，这个染色体数出现在配子中，是大多数体细胞染色体数的一半。

Hemicyst：见 Dome。

Heterokaryon（**异核体**）：有两个或更多遗传物质不同的核的细胞，通常来自细胞融合。

Heteroploid（**异倍体**）：一种培养物，其细胞含有的染色体数不同于二倍体，每一个细胞也都不同。

Histotypic culture（**组织型培养**）：一种模拟体内组织形态学的高密度培养，通常指一种分散细胞通过增殖和形成多层培养或者重新聚集来获得具有组织样的三维结构。另见器官型培养。

Holding medium（**支持培养基**）：通常没有血清和生长因子或者有最小量血清的培养基，是用来将细胞维持在一个可存活但不增殖（举例来说）的状态（例如，收集起来做活检或维持细胞在一个不再增殖的平台期）。

Homocrine（**同分泌**）：相同类型细胞间的旁分泌相互作用。

Homeothennic（**恒温的**）：不管环境温度如何波动都能维持恒定的躯体温度。

Homograft（Allograft）（**同种移植物**）：来源于与受者种系相同但遗传背景不同的捐赠者的移植物。

Homokaryon（**同核体**）：含有两个或多个基因型相同的细胞核的细胞；通常是细胞融合的产物。

Hybrid cell（See synkaryon）[**杂种细胞（见融核体）**]：两个不同细胞融合而成的单个核细胞，可形成受精核。

Ideogram（**核型模式图，染色体模式图**）：根据大小和形态将细胞的染色体按顺序排列起来，这样我们可以研究细胞的核型，进行遗传分析。

Immortalization（**永生性**）：寿命无限性的获得。可以通过转染端粒酶、癌基因或 SV40 基因组的大 T 区诱导，或者通过感染 SV40（整个病毒）或 Epstein-Barr 病毒（EB 病毒）诱导。虽然永生性是恶性转化的一个要素，但并非恶性转化。

Induction（**诱导**）：由特定的刺激物产生的作用增强。

Infection（other than the commonplace definition）[**感染（并非通常的定义）**]：用通常由启动子序列和报道基因，如 β-半乳糖苷酶包装的、含有正在研究的 DNA 序列的重组病毒进行基因组 DNA 的转移；感染产物可以通过显色性底物染色被检测到。

in ovo（**卵内**）：通常指在鸡蛋内。

In situ hybridization（**原位杂交**）：是将特定的互补核苷酸探针结合到细胞内某一区域；cDNA 探针用来定位 mRNA 序列，而 RNA 探针用来定位 DNA 序列（见染色体着色）。用同位素标记或荧光标记探针即可以观察到。

In vitro（**体外**）：字面意思是“在玻璃器皿中”，但是通常用来表示在宿主体外的培养，如细胞培养、器官培养或短期的器官浸泡保存；也用来指在试管中进行的生化或分子反应，但是这些反应更多的是指无细胞反应。

In vivo（**体内**）：在存活的植物或动物体中。

iPS cell（**诱导多能干细胞**）：通过对成体细胞的基因操作或基因表达的表观遗传调控而获得的一种多全能干细胞。

Isograft（Syngraft）（**同种同基因移植物**）：移植物来源于与受体遗传特性一致或几乎一致的同一物种的供体。

Karyotype（**染色体组型**）：一个细胞中特有的染色体组成。

Laminar flow（**层流**）：紧紧沿着流线型表面流动而不形成湍流的气流，对于层流超净台或层流柜则是以工作表面上有稳定的气流以尽可能减少湍流为特征的。

Laminar-flow hood or cabinet（**层流超净台或层流柜**）：过滤后的空气以层流（无湍流）的形式平行或垂直流到工作表面以维持工作台的无菌。平行流称为水平层流，垂直流称为垂直层流。

Leukemia（**白血病**）：造血系统的恶性疾病，明显的特征是外周血中有未成熟细胞进入血液循环。

LIF（**白血病抑制因子**）：属于白细胞介素 6 家族的一种细胞因子；用来抑制 ES 细胞的分化及保持干细胞表型。

Lipofection（**脂质体转染**）：通过与脂质包裹的 DNA 融合转染 DNA。

Log phase（**对数期**）：见生长曲线。

Lymphoma（**淋巴瘤**）：淋巴细胞的实体瘤。

Macroautoradiography（**宏观放射自显影**）：通过紧靠标本的感光乳剂曝光对整个人体断面或电泳制备的印迹中的放射性同位素定位，通常是将胶片和印迹放置在有增感屏的盒子中曝光。

MACS（magnetic-activated cell sorting）（**磁性激活的细胞分选**）：通过包被的铁蛋白珠抗体结合到特殊细胞表面抗原，由铁蛋白产生的磁性吸引力进行的细胞分选。

Malignant（**恶性的**）：浸润性或转移性（如移入其他组织中生长）（对肿瘤而言）。通常是进行性的，导致宿主细胞的破坏，最终导致宿主的死亡。

Malignant transformation（**恶性转化**）：不受时间或空间的控制向正常组织侵袭的能力的形成；也可以导致转移性生长（植入远处的位置随后发生不可控的侵袭性生长）。

Manometer（**压力计**）：含有液体的 U 形管子，U 形管两侧的液体水平反应管子两端的压力差。

Medium（**培养基**）：无机盐和其他能够在体外维持细胞存活 24h 的营养成分的混合物。生长培养基：用于常规培养使细胞数目随时间而增加的培养基。维持培养基：保持细胞存活但不增殖的培养基（如用于血清依赖细胞的低血清或无血清培养基）。该词的复数形式是 media。

Mesenchymal stem cell（MSC）（**间充质干细胞**）：通常起源于骨髓，具有多潜能分化能力，例如，分化成心肌细胞、神经细胞或肝细胞，以及造血细胞谱系（细胞）的干细胞。

Mesenchyme（**间叶细胞**）：来源于中胚层的、松散的、经常为迁移性的胚胎组织，可发育成成体中的结缔组织、软骨、肌肉、造血细胞等。

Mesoderm（**中胚层**）：在胚胎内胚层和外胚层之间的胚细胞层，可发育成间叶细胞，间叶细胞再发育成结缔组织等（见间叶细胞）。

Microautoradiography（**显微放射自显影**）：通过紧靠标本放置的感光乳胶曝光对细胞或组织切片中的放射性同位素定位，通常将标本在溶解的乳胶中浸渍。显影后可将标本放置在显微镜下观察。

Monoclonal（**单克隆的**）：源于单个细胞的克隆。

Morphogenesis（**形态发生**）：有机体形状和结构的形成。

Multipotent stem cell（**多能干细胞**）：能够分化形成多种不同谱系的分化细胞的干细胞。常常和 pluripotent stem cell（**参见该词条**）不好区别，但是通常指局限于某一种组织类型的干细胞可产生该组织的多种细胞谱系，诸如造血系统中的集落形成细胞。

Myeloma（**骨髓瘤**）：来源于髓样细胞的肿瘤；如果骨髓瘤能产生免疫球蛋白，就被用于单克隆抗体的制备。

Neoplastic（**新生物**）：一种新的、非必需的、将发展成肿瘤的细胞增生。

Neoplastic transformation（**新生物转化**）：非肿瘤性细胞向肿瘤性细胞的转变。

Oncogene（**癌基因**）：当转染或感染到正常细胞时可诱发恶性转化的基因，通常具有编码生长因子、受体、信号转导因子或核调控因子的活性。

Organ culture（**器官培养**）：器官原基或整个或部分器官在体外的维持或生长，在某种程度上可以允许分化并保存器官的构筑或功能。

Organogenesis（**器官发生**）：器官的形成。

Organotypic culture（**器官型培养**）：涉及不止一种类型细胞的组织型培养，可获得有细胞间相互作用特征的体内器官模型。它是通过分离细胞或者组织片段的重构获得的，与器官培养有所区别。后者保持有其外植块的结构完整性。另见组织型培养和组织相等物。

Osmolality（**重量渗克分子浓度**）：水溶液中具有渗透活性的粒子浓度，用 Osmol/kg（渗透压摩尔/千克）表示。

Osmolarity（**容积渗克分子浓度**）：水溶液中有渗透活性的粒子浓度，用 Osmol/L（渗透压摩尔/升）表示。

Osmole（**渗透压摩尔**）：含有 1mol 渗透压活性粒子的物质的量。

Paracrine（**旁分泌**）：一个细胞通过可溶性因子，在元脉管系统参与下对毗邻的另一个细胞产生的作用。

Parenchyma（**实质体**）：是组织中起主要功能的某一部分组织，如肝中的肝细胞；与间质不同，如成纤维细胞结缔组织，被看作支持组织。

Pascal（**帕斯卡**）：压力的国际标准单位，等于 $1N/m^2$。

Passage（**传代**）：细胞从一个培养容器到另一个培养容器的转移或次代培养；通常（但并非必须）包括一部分正在增殖的细胞群体，使细胞系或细胞株能够繁殖。

Passage number（**传代次数**）：一种培养物被次代培养的次数。

Pavement-like（**铺路石样细胞**）：规则的单层或多角形细胞。更确切一些，是上皮细胞或上皮样细胞。

Phenotype（**表现型**）：一个细胞表达的所有特性的集合；是基因型和所处常规环境相互作用的产物。

Plateau（**平台期**）：见生长曲线。

Plating efficiency（**贴壁效率**）：次代培养中长成集落的接种细胞的百分比。如果可以说一个集落来源于一个细胞，那么贴壁效率同克隆形成效率一致。有时贴壁效率广泛地用来描述次代培养后存活细胞的数量，但这种情况称为接种效率更确切。

Ploidy（**倍性**）：特定细胞类型的染色体数目与体内正常体细胞中染色体数目之间的关系（另见 baploid、diploid、eu-plaid、aneuploid，以及 heteroploid）。

Pluripotent stem cell（**多能干细胞**）：通过适当的诱导能够产生形成分化细胞的数种不同且不相关细胞谱系的干细胞。

Poikilothermic（**变温的**）：体温接近环境温度而不受代谢调节。

Population density（**群体密度**）：每单位基质面积中单层细胞的数量；悬浮生长的细胞，群体密度与细胞浓度一致。

Population doubling time（**群体倍增时间**）：细胞群体在对数生长期中点数量加倍所需要的时间间隔。

Post-PCR laboratory（**后 PCR 实验室**）：包含能用来进行 PCR 扩增和其他高拷贝数 DNA 分子工作的所有的设备和用品的实验室。该设施中的设备和工作站包括热循环仪、透射仪、遗传分析仪。这些设施与预 PCR 实验室进行隔离，以防止能导致假阳性结果产生的新的 PCR 扩增产物的污染。

Potency（of stem cell）**[（干细胞的）潜能]**：干细胞能够分化成一种或多种不同细胞类型的能力。单能干细胞仅能够产生一个分化途径；双能干细胞产生两个分化途径（例如，造血干细胞产生髓系和淋巴谱系，见图 26.7）；多能同广谱系干细胞多超过两个相关的分化途径（如 CFU、GEMM，见图 26.7）；多能干细胞可以分化为多种潜在且不相关的谱系；全能干细胞可以分化为所有类型的分化细胞（另见胚胎干细胞和间充质干细胞）。

Precursor cell（**前体细胞**）：是指在细胞分化过程中，被假定处于某一阶段并定向分化为某种特殊细胞类型的细胞。细胞在该阶段的早期是具有增殖能力的，晚期则可能没有。

pre-PCR laboratory（**预 PCR 实验室**）：是指一个具有能进行低拷贝数 DNA 分子 PCR 工作的全部设备和物品的实验室。该设施中包括进行基因组 DNA 纯化和 PCR 主混液的准备的工作区。这些设施应与后 PCR 实验室进行隔离，以防止能导致假阳性结果的新的 PCR 扩增产物的污染。

Primary culture（**原代培养**）：从直接取自生物体的细胞、组织或器官开始的，在首次传代培养之前的培养。

Primary explant（**原代外植体培养**）：从机体分离组织块并予以培养，这样做可促进其存活并使有活力细胞外长出来。

Progenitor cell（**祖细胞**）：是指在其发育的早期阶段，可能具有增殖能力，同时尚未表达已分化特性的细胞。

Provenance（**出处**）：细胞系的起源和历史信息，包括有助于其当前状态的操作处理。

Pseudodiploid（**假二倍体**）：从数目上看染色体是二倍体，但存在染色体畸变。

Quasidiploid（**准二倍体**）：见假二倍体。

Reagent（**反应物**）：一种参与某一化学反应的物质，可以是元素、化合物或混合物。

Sarcoma（**肉瘤**）：中胚层来源的细胞发生的肿瘤，如结缔组织、肌肉（肌肉瘤）或骨（骨肉瘤）。

Saturation density（**饱和密度**）：在特定条件下每平方厘米（单层培养）或每毫升（悬浮培养）可得到的最大数量的细胞数。

Seeding efficiency（**接种效率**）：在特定时间段贴附到基质的接种物质（指有生存或存活能力但不一定有增殖能力）的百分比。

Senescence（**衰老**）：一种通过生物学调控的增殖潜能丧失的现象，与染色体的端粒缩短有关。

Skin equivalent [**皮肤相等物（组织工程皮肤）**]：通过器官型培养在体外重构的皮肤，通常含有表皮角质形成细胞、胶原和真皮成纤维细胞，但是缺少黑素细胞、血管、神经及神经内分泌成分。

Somatic cell genetics（**体细胞遗传学**）：通过对体细胞基因的重组或分离（通常利用融合的方法）对细胞遗传学进行的研究。

Spheroid（**球状体**）：通常在非附着的基质上，如琼脂或琼脂糖的悬浮细胞重聚合形成的三维细胞团。

Split ratio（**平分比数**）：在传代时细胞培养物稀释度的除数（例如，从 1 个培养瓶分到 4 个培养瓶或者 100mL 增加到 400mL 时的平分比数是 4）。

Stem cell（**干细胞**）：是指谱系中一种最早期可检测到的、具有生成该谱系所有细胞的能力并能保持它自身群体的细胞另见（干细胞的）潜能。

Stroma（**间质**）：是指组织中仅具有支持（保护）作用的部分组织，如纤维结缔组织和它的脉管系统。

Subconfluent（**准汇合**）：少于汇合；有效基质未全部被覆盖。

Subculture（**次代培养**）：见传代。

Substrate（**基质**）：固体基面，单层细胞在其上面生长。

Superconfluent（**超汇合**）：所有细胞都贴附到基质上后继续生长并出现多层。

Suppressor gene（**抑制基因**）：抑制表型转化（恶性）的基因，通常与细胞增殖或细胞迁移的显性负调节相关。在转化细胞和癌细胞中，抑制基因常发生突变。

Suspension culture（**悬浮培养**）：细胞悬浮在生长培养基中增殖的培养物。

Synkaryon（**融核体**）：细胞核融合产生的杂交细胞。

Telomeres（**端粒**）：是指能阻止与其他染色体重组并能保持细胞增殖能力的染色体末端区域。在衰老过程中其进行性地缩短，但在干细胞和一些肿瘤细胞中可以通过端粒酶保持其长度。

Tetraploid（**四倍体**）：二倍体两倍（单倍体的四倍）的染色体数目。

Three-dimensional（3-D）culture（**三维培养**）：以聚合体或者在基质中或者支架上培养细胞，使细胞呈三维排列，与标准的单层培养的常见二维排列有显著区别。另见组织型培养、器官型培养、球形体。

Tissue culture（**组织培养**）：严格地说，是指体外组织片段的维持，但是现在通常用作捐献的组织移植物培养、器官培养和分散细胞培养（包括增殖细胞系和细胞株的培养）的通用术语。

Tissue equivalent（**组织相等物**）：一种培养物，通常具有组织型特征和三维特征，与体内组织的组织学类似（尽管通常缺少血管、神经及一些其他元件）。另见皮肤相等物。

Totipotent stem cell（**全能干细胞**）：能够产生机体所有组织的干细胞。

Transdifferentiation（**转分化**）：一个谱系的细胞获得分化为不同谱系细胞的能力。

Transfection（**转染**）：当转移的物质少于供体细胞的完整细胞核时，采用人工的方法将遗传物质从一个细胞转移至另一个细胞。通常是转移分离的染色体、DNA或克隆的基因。

Transformation（**转化**）：细胞表型的永久性改变，推测是通过基因不可逆改变发生的。其可以是自发的，就像缓慢生长的初期几代啃齿类细胞系形成快速生长的连续细胞系，或者由于化学或病毒作用诱导发生，通常使细胞系生长速率加快、永生化、低血清需求和贴壁效率升高，这些细胞系常有（但并不一定）致瘤性。

Validation（of cell line）[（**细胞系的**）**确认**]：是指包括细胞系的验证、鉴定和证明无其他细胞系污染的过程。

Variant（**变种**）：稳定表达与其来源的亲代培养物不同表现型的细胞系。

Viral transformation（**病毒转化**）：通过转化病毒的基因和遗传作用诱导的永久性表型的改变。

Xenograft（**异种移植**）：将组织移植到不同于其来源的物种，经常用来描述将人肿瘤植入无胸腺小鼠（裸鼠）、免疫缺陷小鼠或免疫抑制小鼠。

参考文献

Schaeffer WI (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**:97–101.

（王莎丽　译）

索 引

K

L

M

N

P

Q

R

S

T

W

X

Y

Z

其他

[General Information]
书名=14539630
SS号=14539630